

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 6 月 6 日 (06.06.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/43477 A1

(51) 国際特許分類⁷: A01K 67/027, G01N 33/50,
33/15, A61K 39/395, C12N 15/12, 5/16

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/09401

(22) 国際出願日: 2001 年 10 月 25 日 (25.10.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-367296 2000 年 12 月 1 日 (01.12.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人
実験動物中央研究所 (CENTRAL INSTITUTE FOR
EXPERIMENTAL ANIMALS) [JP/JP]; 〒216-0001 神
奈川県川崎市宮前区野川1430番地 Kanagawa (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 伊藤 守 (ITO,
Mamoru) [JP/JP]; 〒216-0022 神奈川県川崎市宮前
区平2丁目12番7-204 Kanagawa (JP). 小林喜美男
(KOBAYASHI, Kimio) [JP/JP]; 〒247-0066 神奈川県
鎌倉市山崎1390番地 レーベンスガルテン山崎3号
棟803号室 Kanagawa (JP). 中畑龍俊 (NAKAHATA,
Tatsutoshi) [JP/JP]; 〒601-8443 京都府京都市南区

西九条東御幸田町13-2-501 Kyoto (JP). 辻浩一郎
(TSUJI, Koichiro) [JP/JP]; 〒108-0071 東京都港区白
金台4-4-12-405 Tokyo (JP). 垣生園子 (HABU, Sonoko)
[JP/JP]; 〒206-0012 東京都多摩市貝取2丁目6-6-402
Tokyo (JP). 小柳義夫 (KOYANAGI, Yoshio) [JP/JP]; 〒
279-0012 千葉県浦安市入船6丁目1-801 Chiba (JP).
山本直樹 (YAMAMOTO, Naoki) [JP/JP]; 〒145-0063
東京都大田区南千束2-16-5 Tokyo (JP). 菅村和夫
(SUGAMURA, Kazuo) [JP/JP]; 〒981-0904 宮城県仙
台市青葉区旭ヶ丘一丁目27-8 Miyagi (JP). 安藤 潔
(ANDO, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒253-0037 神奈川県茅ヶ崎
市菱沼海岸7-66-311 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門
5森ビル3F Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING MOUSE SUITABLE FOR THE TAKE, DIFFERENTIATION AND PROLIFERA-
TION OF HETEROGENOUS CELLS, MOUSE CONSTRUCTED BY THIS METHOD AND USE OF THE MOUSE

(54) 発明の名称: 異種細胞の生着、分化および増殖に適したマウスの作出方法、該方法により作出されたマウスな
らびにマウスの用途

(57) Abstract: An immunodeficient mouse (NOG mouse) suitable for the take, differentiation and proliferation of heterogeneous
cells; and a method of constructing such a mouse. This mouse is obtained by back crossing an NOD/Shi mouse with a C.B-17-scid
mouse, and further crossing a thus obtained mouse with an interleukin 2-receptor γ -chain gene-knockout mouse. It is usable in
construction a human antibody, a stem cell assay system, and construction of a tumor model and a virus-infection model.

(57) 要約:

異種細胞の生着、分化および増殖に適した免疫不全マウス (NOG マウ
ス) および該マウスの作出方法を提供する。該マウスは、NOD/Shi マウ
スに C.B-17-scid マウスを戻し交配することにより得られるマウスに、
さらにインターロイキン 2 受容体 γ 鎖遺伝子をノックアウトしたマウス
を戻し交配することにより得られ、ヒト抗体の作製、幹細胞アッセイ系、
腫瘍モデルおよびウイルス感染モデルの作製に利用することができる。

WO 02/43477 A1

明細書

発明の名称

異種細胞の生着、分化および増殖に適したマウスの作出方法、該方法により作出されたマウスならびにそのマウスの用途

技術分野

本発明は、異種細胞の生着に優れたマウスの作出方法、その方法により作出されたマウスおよびそのマウスの用途に関する。

背景技術

ヒトを始めとする異種細胞を生着させた実験動物は、種々の病態発症機序の解析、その治療や予防のための薬剤開発に極めて重要であり、そのための受容体としての動物の開発は実験動物学の大きなテーマの1つである。特に近年では、幹細胞より分化させた組織や細胞の移植による治療（いわゆる再生治療）などが世界的に注目されるに至って、さらにこれらの動物の重要性が増している。

本発明者らは以前からこうした実験動物の開発・改良を続けてきた。特にヌードマウスや SCID マウスの改良等を行い、これまでにこの目的の為に作製した免疫不全マウス等に関しては既に特許出願を行っている（特開平 9-94040 号公報）。中でも、多機能免疫不全（機能的な T 細胞および B 細胞の欠失、マクロファージ機能減退、補体活性の低下およびナチュラルキラー (NK) 活性低下等）を示す NOD/Shi-scid マウスおよび NOD/LtSz-scid マウスは異種細胞の生着に適した実験動物として最も注目されており、幹細胞分化・増殖を初めとして多様な研究に用い得ることが明らかとなっただけでなく、さらには更に適用範囲が広がっているのが現状である。

しかしながら、上記 NOD/Shi-scid マウスはヒト細胞の生着は高いものの、その生着性にかなりのバラつきが認められる。

NOD/Shi-scid マウスの生着性を高めるためには、抗 IL-2R β 鎖抗体 (TM β 1) や抗アシアロ-GM1 抗体等を投与して前記マウスの NK 活性を減退さ

せることが重要であることが既に明らかにされている (Koyanagi, Y. ら、1997. "Primary human immunodeficiency virus type 1 viremia and central nervous system invasion in a novel hu-PBL-immunodeficient mouse strain." J Virol 71:2417; Koyanagi, Y. ら、1997. "High levels of viremia in hu-PBL-NOD-scid mice with HIV-1 infection." Leukemia 11 Suppl. 3:109; Yoshino H. ら、2000. "Natural killer cell depletion by anti-asialo GM1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-scid mice." Bone Marrow Transplant 26:1211-6. しかし、そうした抗体は極めて高価であり、またその効果も個体によってバラつきが認められる。さらに、抗アシアロ-GM1 抗体を用いる場合、実験期間中は 11 日に 1 度という頻度で投与を行わなくてはならず、煩雑さも付きまとう。

このために、米国 Jackson 研究所の Dr. Shultz, L. D. らは、ヒト細胞高生着性 NOD/LtSz-scid マウスに、NK 活性を消失している $\beta 2m$ KO マウスと交配することによって、NOD/LtSz-scid, $\beta 2m$ null ($\beta 2m$ (null) NOD/SCID) マウス (Kollet O, Peled A, Byk T ら、beta2 microglobulin-deficient ($\beta 2m$ (null)) NOD/SCID mice are excellent recipients for studying human stem cell function. Blood 2000;95(10):3102-5) を作製している。

上記の NOD/LtSz-scid, $\beta 2m$ null マウスにおいては、T 細胞、B 細胞、およびナチュラルキラー (NK) 細胞が消失しており、またマクロファージ、補体の機能が減退している。しかし、移植異種細胞、組織の拒絶には、それら以外の細胞 (例えば、樹状細胞) や因子 (例えば、 $IFN\gamma$) も関与している。

このため、上記の NOD/LtSz-scid, $\beta 2m$ null マウスよりもさらに異種細胞の生着性にバラつきが無く、抗体が不要で、かつ異種細胞の生着性に優れているマウスが望まれる。

発明の開示

そこで本発明は、上記問題点を解決し、異種細胞の生着性に優れているマウスの作出方法および該方法により作出されたマウスを提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、NOD/Shi マウスに C. B-17-scid マウスを戻し交配することにより得られるマウスに、インターロイキン 2 受容体 γ 鎖 (IL-2R γ) 遺伝子をノックアウトしたマウスを戻し交配することにより、異種細胞の生着性にバラつきが無く、かつ抗体が不要な（すなわち、異種細胞の生着に適した）マウスが得られるという知見を得た。本発明は以上の知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

(1) 以下の A のマウスに B のマウスを戻し交配することの特徴とする、異種細胞の生着に適したマウスの作出方法；

A : NOD/Shi マウスに C. B-17-scid マウスを戻し交配することにより得られるマウス、

B : インターロイキン 2 受容体 γ 鎖遺伝子をノックアウトしたマウス。

(2) A のマウスが NOD/Shi-scid マウスである、(1) のマウスの作出方法。

(3) B のマウスが IL-2R γ KO マウスである、(1) または (2) のマウスの作出方法。

(4) (1) ~ (3) のいずれかのマウスの作出方法により作出されたマウス。

(5) 機能的な T 細胞および B 細胞を共に欠失し、マクロファージ機能が減退し、NK 細胞または NK 活性を消失し、かつ樹状細胞機能が減退しており、優れた異種細胞生着性を有していることを特徴とする、N0G (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) マウス。

(6) 移植したヒト幹細胞が、排除されることなく、効率良く分化、増殖する (4) または (5) の N0G マウス。

(7) (4) ~ (6) のいずれかのマウスにヒト幹細胞を移植し、分

化・増殖する細胞を解析することを含む、幹細胞アッセイ方法。

(8) T細胞およびB細胞の分化・増殖を解析する、(7)の幹細胞アッセイ方法。

(9) (4)～(6)のいずれかのマウスにヒト幹細胞を移植し増殖させた後に、該マウスの骨髄からヒト幹細胞を回収しさらに、(4)～(6)のいずれかのマウスに移植することを繰り返し行うことを含むヒト幹細胞を増殖させる方法。

(10) 繰り返しが少なくとも3回である(9)のヒト幹細胞を増殖させる方法。

(11) (9)または(10)の方法で得られた純度が99.7%以上のヒト幹細胞。

(12) ヒト幹細胞が外来遺伝子を導入したものである、(9)または(10)の方法。

(13) ヒトT細胞およびB細胞を安定に保持し、ヒト抗体を産生することが可能な、(4)～(6)のいずれかのマウス。

(14) ヒトT細胞およびB細胞を保持する、(4)～(6)のいずれかのマウスを抗原で免疫することを含む、ヒト抗体の産生方法。

(15) ヒトT細胞およびB細胞を保持する、(4)～(6)のいずれかのマウスを抗原で免疫した後に該マウスから該抗原に対する抗体産生細胞を回収し、株化することを含む、ヒト抗体を産生する抗体産生細胞株を製造する方法。

(16) ヒト腫瘍細胞を保持した(4)～(6)のいずれかのマウスである、ヒト腫瘍モデルマウス。

(17) ヒト腫瘍細胞がHTLV-1白血病由来細胞である、(16)のヒト腫瘍モデルマウス。

(18) ヒト腫瘍細胞を耳介に保持した、(16)または(17)のヒト腫瘍モデルマウス。

(19) (16)～(18)のいずれかのマウスを用いて抗癌剤をスクリーニングする方法。

(20) (4) ~ (6) のいずれかのマウスにヒト腫瘍細胞を移植することを含む、ヒト腫瘍モデルマウスを作出する方法。

(21) ヒト腫瘍細胞が HTLV-1 白血病由来細胞である、(16) の方法。

(22) ヒト腫瘍細胞をマウスの耳介に移植する、(20) または (21) の方法。

(23) マクロファージトロピックなウイルスばかりでなく、T トロピック (T 細胞親和性) なウイルスに感染した T 細胞を保持した (4) ~ (6) のいずれかのマウスである、ウイルス感染モデルマウス。

(24) ウイルスが HIV である、(23) のウイルス感染モデルマウス。

(25) ウイルスが HTLV-1 である、(23) のウイルス感染モデルマウス。

(26) (23) ~ (25) のマウスを用いて抗ウイルス剤をスクリーニングする方法。

(27) (3) ~ (6) のマウスを用いて、NOD マウスよりも異種細胞の生着性が向上した免疫不全マウスを作出する方法。

(28) NOD マウスよりも異種細胞の生着性が向上した免疫不全マウスを作出するための、(3) ~ (6) のマウス。

以下、本発明の一般的実施態様について説明する。

1. 本発明のマウスの作出

本発明の異種細胞の生着に適したマウスの作出方法は、以下の A のマウスに B のマウスを戻し交配することを特徴とする；

A : NOD/Shi マウスに C. B-17-scid マウスを戻し交配することにより得られるマウス、

B : インターロイキン 2 受容体 γ 鎖遺伝子をノックアウトしたマウス。

ここで異種細胞としては、ヒトを始めとしてマウス、ラット等の哺乳動物由来の細胞や組織、特にヒトの幹細胞、リンパ球や腫瘍細胞等を挙げることができるが、これらに限定されない。

A のマウスにおける NOD/Shi マウスへの C. B-17-scid マウスの戻し交

配は、当業者に公知の手法、例えば、Cross Intercross 法による戻し交配 (Inbred Strains in Biomedical Research, M.F.W. Festing, 1979, ISBN 0-333-23809-5, The Macmillan Press, London and Basingstoke) に従い、C. B-17-scid マウスと NOD/Shi マウスとを交配し、その F1 マウス同士を更に交配して得た F2 マウスの血清中の免疫グロブリン量を測定し、検出できないマウスを選別する。このマウスを再び NOD/Shi マウスと交配する。この操作を 9 回以上繰り返し (Cross Intercross 法) 行うことによって実施できる。

尚、NOD/Shi マウスおよび C. B-17-scid マウスは共に日本クレア株式会社から販売されている。また、これらのマウスの交配により得られるマウスとしては、例えば、本発明者らが以前に樹立した NOD/Shi-scid マウス (または、NOD-scid と呼ぶ) (特開平 9-94040 号公報) があり、これを日本クレア株式会社から入手して直接 A のマウスとして用いることもできる。尚、NOD/Shi マウスおよび NOD/Shi-scid マウスについては、上記以外に本出願人も所持しており、必要に応じていつでも分譲することができる。

また、B のマウスにおけるインターロイキン 2 受容体 γ 鎖 (IL-2R γ) 遺伝子のノックアウトは、当業者に公知の手法、例えば、マウス ES 細胞を用いた相同組換えの手法 (Capecchi, M. R., Altering the genome by homologous recombination, Science, (1989) 244, 1288-1292) に従い、マウス由来の特定の遺伝子と例えばネオマイシン等の薬剤耐性遺伝子を含む相同遺伝子とを ES 細胞の段階で置き換えた後、該 ES 細胞を受精卵に注入することにより実施できる。

具体的には、例えば、129/SV マウスのゲノムライブラリーからヒトの IL-2R γ cDNA をプローブとしてマウス IL-2R γ を含む遺伝子クローンを単離し、該クローンのうち IL-2R γ 全長を含む 8.6kb の大きさの断片を使用してターゲッティングベクターを作製する。すなわち、前記断片の IL-2R のエクソン 7 と 8 との間にネオマイシン耐性遺伝子を発現する PM Cl-neo ポリ A を挿入し、またエクソン 8 から 1kb 離れた 3' 側にジフテリア毒素-A 遺伝子を配置する。次いで、前記ベクターを直鎖状にし、E14

ES 細胞 1×10^7 個に電気穿孔法で導入する。その後、G418 を含む培養液の中で相対的組換えを起こした ES クローンを選択し (PCR またはサザン法で確認)、該 ES クローンを C57BL/6 マウスの胚盤胞に注入した後、仮親マウスの子宮に移植する。この仮親マウスから生まれたキメラマウスを更に C57BL/6 マウスと交配することによって、生殖細胞系に伝達した IL-2R γ KO ヘテロマウスを得ることができる。

あるいは、既に確立されているインターロイキン 2 受容体 γ 鎖遺伝子 (IL-2R γ) ノックアウトマウス系統を直接入手して用いてもよく、こうしたマウス系統として、例えば、IL-2R γ KO マウス系統 (菅村和男教授 [東北大学医学部生体防御学講座・免疫分野] より作出されたインターロイキン 2 受容体 γ 鎖 (IL-2R γ) ノックアウトマウス (Ohno K, Suda T, Hashiyama M ら、Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. Blood 1996;87 (3):956-67)) がある。尚、IL-2R γ KO マウスは、作出者である菅原教授の委嘱によって、現在は本出願人ら ((財) 実験動物中央研究所) の胚保存バンクの中で保存されており、必要に応じていつでも凍結胚または融解還元マウスとして提供することができる。

さらに、A のマウスへの B のマウスの戻し交配は、上記と同様に、当業者に公知の手法、例えば、上述の戻し交配に従い、すなわち NOD/Shi-scid マウスと IL-2R γ KO マウスとを交配し、その F1 マウスを NOD/Shi-scid マウスに戻し交配することにより実施できる。

また、本発明のマウスは、上記本発明の方法により作出されたマウスであることを特徴とする。本発明のマウスを NOG マウス (NOG マウス; NOD/Shi-scid, γ c null マウス; NOD/Shi-scid, IL-2R γ chain-/- マウス; NOD/Shi-scid, IL-2R(γ c)^{null} マウスなど) と称する。

本発明のマウスは、機能的な T 細胞および B 細胞を共に欠失し、マクロファージ機能が減退し、NK 細胞または NK 活性を消失している重度の免疫不全マウスである。このため、本発明のマウスに異種細胞 (例えば、ヒト末梢血単核球) を移入した場合、抗 NK 抗体処理を施した従来の免疫不全マウスと比較してもさらに高率の生着・増殖が認められる (後述の実

施例 1 を参照されたい)。また、本発明のマウスは樹状細胞の機能も不全であり、サイトカインの産生も著しく減退している。従って、本発明のマウスは従来の免疫不全マウスと比較して最も優れた異種細胞生着性を有しており、このマウスに生着する様々な移入異種細胞(幹細胞、分化細胞および癌細胞を含む)の解析に有効であると考えられる。さらに、HIV、HTLV-1 や癌の病態モデルマウスの確立、ヒト型抗体の作製に利用することも可能である。

以下、本発明のマウスの用途について述べる。用いるマウスは、通常 8~12 週齢のものが好ましいが、限定はされない。

2. 本発明のマウスを用いたヒト幹細胞アッセイ系の確立

本発明のマウスを用いて、ヒト幹細胞の分化、増殖に関与する因子、機構の検討を行うためのヒト幹細胞アッセイ系を確立することができる。また、ヒト幹細胞アッセイ系を用いることにより種々の治療薬の探索も可能になる。

ヒト幹細胞アッセイ系の確立は、本発明のマウスに、ヒト幹細胞を移入することにより行うことができる。ここで、幹細胞とは造血幹細胞の他、神経幹細胞等の造血系由来ではない幹細胞も含む。ヒト幹細胞は、抗体によって同定される特異的なエピトープ部位と関連する細胞表面マーカーの存在によって同定され、例えばヒト骨髓、臍帯血、末梢血等から CD34 陽性細胞として単離することができる。

幹細胞を生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水等の細胞および生体に影響を与えない溶液に懸濁させて、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 細胞をマウスの静脈内に投与することにより移植することができる。

移植後、数週間後に細胞を移植したマウスの末梢血、脾臓、骨髓、胸腺等の各臓器から細胞を回収し、その表面抗原を例えば FACS (Fluorescence-activated cell sorter) を用いて調べることにより移植した細胞の分化を調べることができる。この際指標となる細胞表面の抗原マーカーとしては、幹細胞に関連するものとして CD34、T 細胞に関連するものとして CD3、CD4、CD8 等、B 細胞に関連するものとして CD10、

CD19、CD20 等、B1a 細胞に関連するものとして CD5 等、骨髄系細胞に関連するものとして CD33 等、樹状細胞に関連するものとして CD11c 等、リンパ球全体に関連するものとして CD45 等、マクロファージに関連するものとして CD11a、CD11b 等、NK 細胞に関連するものとして CD56 等、形質細胞に関連するものとして CD38 等、血小板に関連するものとして CD41 等、赤血球に関連するものとしてグリコフォリン A 等が挙げられ、必要に応じて各種の関連マーカーを選択することができる。

また、回収した細胞からのインターフェロン、インターロイキン、TNF α 等のサイトカインの産生を ELISA 等により測定することによっても、幹細胞の分化を調べることができる。

さらに、本発明のマウスを用いれば、ヒト幹細胞の継代移植が可能であり、すなわち自己複製可能な真のヒト幹細胞を得ることができる。具体的には、本発明のマウスにヒト幹細胞を移植し、数週間後にマウス骨髄から未分化のヒト幹細胞を回収し、さらに回収した該幹細胞を本発明のマウスに移植する。この移植および回収を繰り返すことにより、他の細胞の混入のない純度の高いヒト幹細胞を大量に得ることができる。継代移植により、少なくとも純度 99% 以上、好適には 99.7% 以上のヒト幹細胞を得ることができる。従来のマウスにおいては、2 次移植までしか可能でなかったが、本発明のマウスでは 2 回を超える継代移植も可能となった。

本発明のマウスを用いて得られたヒト幹細胞を、白血病等の治療のためにヒトに移植することが可能であるし、またヒト幹細胞に外来遺伝子を導入し、本発明のマウスに移植して、増殖させることによりヒト幹細胞を標的とした遺伝子治療に用いることもできる。幹細胞への遺伝子導入は、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて可能である。ここで用いる遺伝子として例えば、アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症患者に対して ADA 遺伝子等が挙げられる。これらの遺伝子をヒト幹細胞に導入した後に、本発明のマウスに移植し、増殖・

純化し患者に投与することにより遺伝子治療が可能になる。

3. 本発明のマウスを用いたヒト抗体の産生

本発明のマウスを用いて、ヒト抗体を産生するヒト株化細胞およびヒト抗体を得ることができる。本発明のマウスに上述のヒト幹細胞を移植して、T細胞、B細胞等の免疫担当細胞を分化・増殖させるか、あるいはマウスにヒト T細胞、B細胞等の免疫担当細胞を移植してマウス体内に生着させることにより、ヒト抗体を産生し得るヒト免疫担当細胞を保持したマウスを得ることができる。ヒト幹細胞を移植した場合、6～8週間でT細胞およびB細胞の分化・増殖が認められ、ヒト抗体の産生が可能になる。

ヒトのT細胞およびB細胞を生着・保持したマウスに抗原を投与することにより該抗原に対するヒト抗体および該抗体を産生する細胞を得ることができる。本発明のマウスへの抗原投与は、通常マウスに免疫を行うときと同様の方法で行えばよい。

ヒト抗体産生細胞は、マウスの各臓器、特に脾臓、リンパ節等から回収することができる。ヒト抗体産生細胞の割合が多い場合は回収細胞をそのまま株化に用いることができるが、割合が小さい場合は、適宜抗ヒトB細胞抗体を用いたアフィニティーカラム法等で精製すればよい。また、混入しているマウス細胞を抗マウス抗体および補体を用いた細胞溶解法等により除去しておくのが望ましい。

このようにして得られたヒト抗体産生細胞をエプスタインバーウイルス(EBV)による形質転換法、適当な増殖生細胞と融合することによる細胞融合法等により株化し、抗体を産生しつつ長期継代が可能なヒト抗体産生株化細胞を得ることができる。

4. 腫瘍病態モデルマウスの作出

本発明のマウス中でヒト腫瘍を生着・増殖させることも可能であり、本発明のマウスに腫瘍細胞を移植することにより、ヒト腫瘍の動物モデルを得ることができる。例えば、ヒト腫瘍細胞を投与することによりマウス体内で増殖し、ヒト腫瘍を有するマウスを得ることができる。この

際用いる細胞として、従来のヌードマウスでのヒト腫瘍継代株、ED-40515(-)、MT-1、TL-0ml等のHTLV-1白血病由来細胞株等が挙げられる。また、ヒトの腫瘍組織を数mmの大きさに切り刻んでその癌組織片を直接、本発明のマウスに移植して生着させてもよい。この際、腫瘍細胞、組織を移植するマウスの部位は限られず、細胞の場合はマウスの腹腔内、静脈内または皮下に移植し、組織の場合はマウスの皮下に移植することができる。皮下は臀部皮下等マウスのどの部分の皮下でもよいが、切開することなく腫瘍を確認することができるという点で、耳介皮下や背部皮下へ移植することが望ましい。また、抗癌剤の臨床効果を反映した結果を得ようとする場合は、同所移植（大腸癌細胞の場合は大腸に移植する）が望ましい。細胞を移植した場合、数週間から数ヶ月で腫瘍が形成され、特にHTLV-1細胞を耳介後部皮下に移植した場合、2週間で腫瘍が形成され、実用的な腫瘍モデルマウスを迅速に作出することができる。

さらに、本発明のマウスに腫瘍を移植した場合、白血化等の腫瘍細胞の転移も認められ、腫瘍の転移のモデル動物として利用することもできる。

このようにして得られたヒト腫瘍モデルマウスを用いて、抗癌剤、癌転移抑制剤等のスクリーニングを行うことができる。この方法としては、腫瘍を形成したマウスに、経口、経皮等の適当な方法で候補薬剤を投与し、腫瘍の大きさ、転移巣の数・大きさ、マウスの生死等を観察することにより薬剤の効果を判定することができる。

5. ウイルス感染症病態モデルマウスの作出

本発明のマウスを用いてウイルス感染症病態モデルマウスを得ることができる。すなわち、本発明のマウスにヒトウイルスが感染しうる細胞を移植し該ウイルスを感染させることにより、あるいはウイルスの感染した細胞を移植することにより、ウイルス感染細胞を体内に生着・保持したウイルス感染症病態モデル動物を得ることができる。

従来のマウスでは、マクロファージに感染するMトロピック(M-tropic)ウイルスのみの増殖が可能であったが、本発明のマウスを

用いて T 細胞に感染する HIV、HTLV-1 等の T トロピック (T-tropic) ウイルスの増殖も可能になった。

例えば、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ のヒト末梢血単核細胞を本発明のマウス腹腔内に投与し、数日後に数百～数千 TCID₅₀ の HIV を接種することにより、ヒト細胞に HIV が感染した HIV 感染モデルマウスを得ることができる。HIV の感染は、p24 陽性細胞等の HIV 抗原の発現を指標に検出することができる。

HIV の代わりに、HTLV-1 を接種させることにより、HTLV-1 感染モデルマウスを得ることができる。

本発明により得られた病態モデル動物を用いて、HIV、HTLV-1 等の *in vivo* における増殖機構の研究を行うことができ、またウイルス感染治療法の開発、ウイルス感染治療剤のスクリーニング等を行うことができる。

6. NOG マウスを用いた異種細胞生着性の向上したマウスの作出

本発明の NOG マウスを用いて、より異種細胞生着性の向上したマウスを作出することができる。例えば、本発明の NOG マウスにマウスの免疫系に関与する遺伝子をノックアウトしたマウスを戻し交配することにより得ることができる。免疫系に関与する遺伝子として、例えばサイトカイン受容体遺伝子、サイトカイン遺伝子等がある。

また、ヒト細胞の分化、増殖に関与するヒトサイトカイン遺伝子等（例えば、hGM-CSF や hSCF 等）を導入することによってもより異種細胞生着性の向上したマウスを作出することができる。例えば、Pro. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384, 1980 の方法等に従って、上記遺伝子をマウスの前核期受精卵に注入し、この導入遺伝子が組み込まれた個体を選別することによってヒトサイトカイン遺伝子等を発現するマウスを作出し、これと本発明の NOG マウスを交配することによりする異種細胞生着性の向上したマウスを作出することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、NOG マウスを作出するための戻し交配の概略を示す。

図 2 は、CD34 陽性細胞を移植した NOG マウスでのマウス末梢血におけるヒト CD45 陽性細胞とヒト CD41 陽性細胞の移入後の経時的な推移を示す。

図 3 は、CD34 陽性細胞を移植した NOG マウスでの骨髓、脾臓での CD45 陽性細胞の比率を示す。

図 4 は、NOG マウスと $\beta 2$ microglobulin deficient NOD-SCID マウス (NOD/LtSz-scid, $\beta 2m$ null マウス) の比較実験においてのマウス末梢血中の CD45 陽性細胞の比率を示す。

図 5 は、各種系統マウスより得られた脾細胞での NK 細胞および樹状細胞の FACS パターンを示す。

図 6 は、各種系統マウスより得られた脾細胞のリステリア・モノサイトジェネス抗原刺激下でのサイトカインの産生量を ELISA で検出した結果を示す。

図 7 は、NOG および NOD/LtSz-scid, $\beta 2m$ null マウスにおける NK 活性の消失を示す。

図 8 は、ヒト CD34 陽性細胞の 1 次、2 次および 3 次移植マウスの骨髓細胞をヒト CD45 で染色した FACS の結果を示す。

図 9 は、ヒト CD34 陽性細胞を移入した NOG マウス胸腺でのヒト細胞の生着と分化を示す。

図 10 は、ヒト CD34 陽性細胞を移入した NOG マウス胸腺でのヒト細胞の生着と分化を示す。

図 11 は、ヒト CD34 陽性細胞を移入した NOG マウス脾臓でのヒト細胞の生着と分化を示す。

図 12 は、ヒト CD34 陽性細胞を移入した NOG マウス脾臓でのヒト細胞の生着と分化を示す。

図 13 は、ヒト CD34 陽性細胞を移入した NOG マウス末梢血でのヒト細胞の生着と分化を示す。

図 14 は、ヒト CD34 陽性細胞を移入した NOG マウス骨髓でのヒト細胞の生着と分化を示す。

図 1 5 は、NOG マウスにおけるヒト抗体産生能を示す。

図 1 6 は、各系統マウスに LM-2-JCK 移植した後の腫瘍形成を示す。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例 1 NK 活性を消失かつ、樹状細胞機能を減退させた免疫不全マウス (NOG マウス) の作製、該マウスにおける異種細胞生着性の検討および該マウスを用いたヒト幹細胞のアッセイ系の確立

(1) NK 活性を消失かつ、樹状細胞機能を減退させた免疫不全マウス (NOG マウス) の作製

NK 活性を消失させた多機能免疫不全マウスを得るために、(財) 実験動物中央研究所で維持している NOD/Shi-scid マウス (日本クレア K. K. から入手可) (8 週齢) に、菅村和夫教授 (東北大学医学部生体防御学講座・免疫分野) より譲渡されたインターロイキン 2 受容体 γ 鎖ノックアウトマウス (IL-2R γ KO マウス) (8 週齢) を戻し交配することによって、IL-2R γ 変異遺伝子を導入した F1 マウスを作製した。F1 マウスでの変異 IL-2R γ 鎖遺伝子の導入は、該遺伝子を PCR で増幅して検出することにより確認した。具体的には、まず F1 マウスの眼底より採取した血液 100 μ L から DNA 自動抽出機 (MagExtractor、TOYOBO 社製) により DNA を抽出した。この DNA 1.5 μ L に、23.5 μ L の 1.5mM MgCl₂、0.4mM dNTP および 25pmol の 2 セットのプライマー (野生型の判定には下記プライマー PI と PIII のセット、変異型を判定するには同 PI と PII のセットを用いた) を含む PCR 緩衝液を添加し、IL-2R γ 鎖遺伝子の野生型と変異型とを判定する PCR を下記増幅条件下で行った。

(プライマー)

PI : 5'-CTGCTCAGAATGATGCCTCCAATTCC-3' (配列番号 1)

PII : 5'-CCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAAT-3' (配列番号 2)

PIII : 5'-GATCCAGATTGCCAAGGTGAGTAG-3' (配列番号 3)

(PCR 増幅条件)

94℃で5分の加熱処理後、94℃で1分、55℃で1分、72℃で1分を1サイクルとして30～35サイクル実施し、その後72℃で10分加熱した。

上記PCRで得られたPCR産物を2%アガロースゲル中で電気泳動に供し、エチジウムブロミド染色後に検出される発色バンドのサイズで判定した。野生型では約660bp、変異型では約350bpのサイズのバンドが認められた。

(戻し交配)

次に、この変異IL-2R γ 遺伝子を導入したF1マウスをNOD/Shi-scidマウスと交配することによりF2マウスを得た。さらにF2マウスでの変異IL-2R γ 鎖遺伝子の導入を上記同様に検出し、かつ血清中の免疫グロブリンを単純免疫拡散法により検出することにより、変異IL-2R γ 鎖遺伝子を有し、かつscid遺伝子がホモであるマウス個体を選別した。その後、上記マウス個体をNOD/Shi-scidマウスに掛け合わせて、得られた産仔のうち変異IL-2R γ 鎖遺伝子を有するものをさらにNOD/Shi-scidマウスと交配した。

以上の戻し交配を少なくとも9回行うことにより、NOG (NOG) マウスを作出した(概略を図1に示す)。ここで、IL-2R γ 鎖遺伝子はX鎖染色体上にあるため、雄マウスにIL-2R γ K0マウスを使用することが有効である。

(2) NOG マウスにおける異種細胞生着性の検討

次に、上記交配により得られたNOGマウスと従来の免疫不全マウスであるNOD/Shi-scidマウスとを用いて、これらのマウスへの異種細胞生着性に抗NK抗体処理が与える影響の程度について試験した。

① (抗IL-2受容体 β 鎖モノクローナル抗体)

抗IL-2受容体 β 鎖モノクローナル抗体(クローンTM β 1)は、大阪大学医学部の宮坂昌之教授により作製され(Tanaka T, Tsudo M, Karasuyama Hら、A novel monoclonal antibody against murine IL-2Receptor beta-chain. Characterization of receptor expression in normal lymphoid cells and EL-4 cells. J Immunol 1991;147(7):2222-8)、供与されたハイブリドーマから作製した。具体的には、該ハイブリドーマをBALB/cA-nuマウスに腹腔内投与し、その数週間後の腹水より採取した。

この抗体を、NOD/Shi-scid マウス 5 匹 (8~12 週齢)、NOG マウス 3 匹 (8~12 週齢) に、マウス 1 匹当たり 1 mg ずつ腹腔内投与した。また、抗体非投与対照として、NOG マウス 4 匹 (8~12 週齢) に生理食塩水を投与した。

また、ヒト末梢血リンパ球は、ボランティアより採取した血液より、リンホプレップによる比重遠心法を用いて採取した。

得られたヒト末梢血単核球 1×10^7 個を、TM β 1 投与後 2 日目の上記マウスの腹腔内に投与した。

ヒト末梢血単核球の投与から 2 週間後にマウスを処分し、全腹腔滲出細胞を含む腹水を RPMI-1640 培養液で十分洗浄することにより回収した。全腹腔細胞中の全腹腔滲出細胞をフローサイトメトリーを用いて計測し、その数により、ヒト細胞のマウスへの生着性・増殖性を判定した。抗体非投与対照についても同様の操作を行った。この結果を表 1 に示す。

表 1

抗 NK 抗体 (TM β 1) が NOD/Shi-scid マウスおよび NOG マウスにおける
ヒト末梢血単核球の生着・増殖性に及ぼす影響

マウス系統	TM β 1 処置	マウスの数	回収した細胞数 ($\times 10^6$ 個、分布)	ヒト細胞%		
				HLA+ (分布)	hCD4+	hCD8+
NOD/Shi-scid	+	5	4.8 (2.77-6.8)	41.1 (4.2-65)	ND	ND
NOG	+	3	11.1 (8.3-15.0)	61.9 (47.4-74.6)	19.8	28.2
	-	4	11.2 (7.9-20)	63.3 (51.4-69.7)	34.3	25.9

表 1 に示す結果から、ヒト末梢血単核球を移入した NOG マウスでは、従来の TM β 1 処置マウスと比較して、該抗体処置無しでも極めて高率のヒト細胞が分化、生着、増殖することが明らかとなった。

② (抗アシアロ-GM1 抗体)

次に、NOG マウスおよび NOD/Shi-scid マウスを用いて、これらのマウスへのヒト臍帯血由来細胞の生着性に抗アシアロ-GM1 抗体 (AGM1) (ウサギ) (和光純薬工業 K. K.、014-09801) が与える影響の程度について試験した。

先ず、表 2 に示すように番号付けした NOG マウス (8~12 週齢) および NOD/Shi-scid マウス (8~12 週齢) に 2.4 Gy の X 線を照射した。次に、これらのマウスに、投与直前にマウス 1 匹当たり 20 μ L の抗アシアロ-GM1 抗体を 400 μ L の PBS で希釈したものを投与した。また、抗体非投与対照のマウス (表 2 中、5, 6, 10, 11, 15, 16 番のマウス) には生理食塩水を腹腔内投与した。

ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞は、予め承認を得たボランティアより採取した臍帯血から Ficoll-Hypaque 比重遠心により単核球を採取し、さらに Dynabeads M-450 CD34 および DETACHaBEAD CD34 (Dynal As, Oslo, Norway) によって、CD34 陽性細胞を分離した (Ueda T, Tsuji K, Yoshino H ら、Expansion of human NOD/SCID -repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. J Clin Invest 2000;105(7):1013-21)。

上記で得られたヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞 1×10^5 個を、抗アシアロ-GM1 抗体投与直後にマウスの尾静脈より移入した。

ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞の投与から 4 週間後にマウスを処分し、末梢血を採取し、単核球中のヒト細胞 (CD45+) および全血中のヒト血小板 (CD41+) をフローサイトメトリーを用いて計測し、その数により、ヒト細胞のマウスへの生着性・増殖性を判定した。抗体非投与対象についても同様の操作を行った。この結果を表 2 に示す。

表 2

NOG マウスにおける移入ヒト臍帯血 CD34+の分化と増殖

マウス		マウス 系統	AGM1 処置	移入CD34+ 細胞数	移入後4週							
マウス 番号					移入後 日数	白血球数 (10 ³ /ul)	赤血球数 (10 ⁴ /ul)	血小板数 (10 ⁴ /ul)	hCD45+ (%)	hCD45+ (/ul)	hCD41+ (%)	hCD41+ (/ul)
1		NOD/Shi-scid	+	100000	31 (4wk)	12	782	134	0.19	2	0.001	20
2		NOD/Shi-scid	+	100000	31 (4wk)	12	809	147	0.94	11	0.022	318
3		NOD/Shi-scid	-	100000	31 (4wk)	10	758	104	0.48	5	0.004	41
4		NOD/Shi-scid	-	100000	31 (4wk)	14	773	109	3.24	45	0.166	1814
5		NOG	-	100000	31 (4wk)	12	713	89.3	5.84	70	0.255	2274
6		NOG	-	100000	31 (4wk)	17	749	108	9.29	158	0.324	3498
7		NOD/Shi-scid	+	100000	29 (4wk)	10	734	139	1.82	18	0.056	772
8		NOD/Shi-scid	+	100000	29 (4wk)	10	787	118	1.51	15	0.094	1105
9		NOD/Shi-scid	-	100000	29 (4wk)	7	722	132	0.97	7	0.059	776
10		NOG	-	100000	29 (4wk)	36	602	218.1	1.84	66	0.170	3709
11		NOG	-	100000	29 (4wk)	10	725	111	9.28	93	0.518	5748
12		NOD/Shi-scid	+	100000	28 (4wk)	7	696	92.4	1.74	12	0.007	63
13		NOD/Shi-scid	+	100000	28 (4wk)	10	787	96	0.40	4	0.008	73
14		NOD/Shi-scid	-	100000	28 (4wk)	10	710	82.6	0.41	4	0.021	173
15		NOG	-	100000	28 (4wk)	2	684	103	8.52	17	0.101	1040
16		NOG	-	100000	28 (4wk)	2	773	86.5	14.98	30	0.196	1692
<hr/>												
平均							NOD/Shi-scid(AGM1+)		1.10	10.52	0.03	391.74
							NOD/Shi-scid(AGM1-)		1.27	15.25	0.06	701.14
							NOG		7.11	61.99	0.22	2565.96

表 2 に示す結果から、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を移入した NOG マウスでは、従来の抗アシアロ-GM1 抗体処置マウスと比較して、該抗体処置無しでも極めて高率のヒト細胞が分化、生着、増殖することが明らかとなった。

(3) NOG マウスを用いたヒト幹細胞のアッセイ系の確立

マウスは、NOD/Shi-scid マウスおよび本発明の NOG マウスを用いた。ヒト臍帯血 (CB) から採取した CD34 陽性細胞の 1×10^5 細胞を 2.4 Gy の放射線照射した上述のマウスに移植した。

末梢血、骨髓、脾臓および胸腺中のヒト細胞を FACS で解析した。移植 8 週間後の末梢血中の CD45 陽性細胞の比率は、NOG マウスでは 37% で、NOD/Shi-scid マウスでは 7% であった。骨髓ではそれぞれ 65% および 20% であった。高率なキメリズムに加えて、NOG マウスでは、移植 3 ヶ月後の末梢血、骨髓、脾臓、胸腺において、B および T リンパ球を含む多様な細胞系列への分化が認められた。骨髓では、ヒト CD33+ 骨髓細胞、CD19+B 細胞、CD3+T 細胞、CD56+NK 細胞、CD41a+ 巨大核細胞およびグリコフォリン A+ 赤血球が認められた。さらに、興味深いことに、胸腺で認められたヒト T 細胞は少なかったが、脾臓では CD4+/CD8- T 細胞、CD4-/CD8+ T 細胞および CD4+/CD8+ T 細胞が認められた。このことは、ヒト造血幹細胞は胸腺以外の場所で成熟 T 細胞へ分化増殖することを示している。

予め同意を得た正常妊娠の母の健康な新生児の出生時に臍帯血を得た。臍帯血はヘパリン化して保存し、採取より 24 時間以内に以下の操作により処理し、移植実験に使用した。

CD34 陽性細胞純化は以下のようにして行った。ヘパリン化した臍帯血はリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline) に 5% のウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum) を混ぜた緩衝液にて 2 倍希釈した後、Ficoll を用いて単核球を分離した。分離した単核球は Dynal 社の Dynabeads (商標) M-450 CD34 を用いて CD34 陽性細胞に純化した。方法は Dynal 社の指示通りであるが、概説すると 2% ウシ血清アルブミン (Bovine Serum

Albumin)とクエン酸ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水を用いて単核球を $4 \times 10^7/\text{mL}$ の濃度に調整した。よく懸濁した Dynabeads CD34 を単核球浮遊液 1mL あたり 100 μL 加え、氷上で 30 分間、混和しながら反応させた。細胞とロゼットを形成した Beads は磁石を用いて回収した。続いてロゼットを形成している Beads に Detachabead (商標) CD34 を必要量加え 37°C で混和しながら 15 分反応させた。CD34 陽性細胞は Beads から遊離するため、磁石を用いて Beads のみを除去し、CD34 陽性細胞を得た。

移植には SPF (specific pathogen free) の環境下で飼育された 8~12 週齢の NOD/Shi-scid マウス、NOG マウスおよび NOD/LtSz-scid, $\beta 2\text{m null}$ マウスを用いた。これらのマウスは京都大学医学部動物実験施設にて施設の規約に則って飼育された。

前 2 者の比較の実験ではそれぞれ 1.2Gy のガンマ線 (ガンマセル ^{137}Cs) を 2 回照射し、マウス 1 匹につき 10 万個の CD34 陽性細胞を尾静脈より移植した。NOD/Shi-scid マウスについては移植直前と移植後 11 日おきに腹腔内に抗アシアロ GM1 抗体 (和光純薬) を 200 μg 投与した。

NOG マウスと NOD/LtSz-scid, $\beta 2\text{m null}$ マウスの比較実験では、上記と同様に両者に 1.2Gy のガンマ線を 2 回照射したのち CD34 陽性細胞 4 万個もしくは 1 万個を尾静脈から移植した。

移植後のマウスには飲料水に硫酸ネオマシン 732mg/L を加えて、感染を防御した。

マウスは示された時期にエーテル麻酔の上、眼窩静脈叢より末梢血を採血してヒト血球陽性率をフローサイトメトリーを用いて測定した。フローサイトメトリーは広く行われている一般的方法によるが、概説すると、採血した血液は直ちに EDTA-2Na に十分混和し、解析まで室温に放置した。全血の 50~100 μL に至適量の抗体を加え、4°C で 30 分間反応させた後、FACS 溶解液 (Beckton Dickinson 社) を用いて溶血、固定し、FACS Calibur (Beckton Dickinson 社) を用いて測定した。骨髓、脾臓の場合は頸椎脱臼にてマウスを処分したのち大腿骨、脾臓を取り出し、5%ウシ

胎児血清を含む培養液中にそれぞれ、骨髓、脾細胞を遊離させ、細胞浮遊液として、後は末梢血とほぼ同様に処理し、フローサイトメトリー法によって解析した。

解析に用いた抗体は、抗ヒト CD45FITC 抗体、抗ヒト CD10PE 抗体、抗ヒト CD33PE 抗体、抗ヒト CD3PE 抗体、抗ヒト CD34PE 抗体、抗ヒト CD41PE 抗体 (Beckton Dickinson)、抗ヒト CD38PC5 抗体、抗ヒト CD56PC5 抗体、抗ヒト CD19PC5 抗体 (Immunotech)、抗マウス CD45APC、抗マウス CD41FITC 抗体 (BD Pharmingen) であった。

マウス末梢血中におけるヒト CD45 陽性細胞とヒト CD41 陽性細胞の比率 (%) と絶対数 (/ μ L) の推移を 4 週おきに 12 週まで調べた (図 2 A および図 2 B)。図 2 A および図 2 B に示すとおり、NOG マウスにおいて、有意な高い比率と絶対数が認められた。移植 12 週以降でマウスを処分し、骨髓、脾臓で同様にヒト CD45 陽性細胞の比率を調べたところ NOG マウスで非常に高い陽性率を示した (図 3)。

NOG マウスと NOD/LtSz-scid, β 2m null マウスの比較実験ではマウス末梢血中におけるヒト CD45 陽性細胞の陽性率を調べた (図 4)。図 4 に示すように、NOG マウスにおいて NOD/LtSz-scid, β 2m null マウスより高いヒト細胞陽性率を示し、ヒト細胞の生着性に優れていた。

実施例 2 NOG マウスの NK 活性およびサイトカイン産生における樹状細胞の機能不全の検討

本発明の NOG マウス (10~12 週齢) の雌 3 匹、NOD/Shi マウスに C. B-17-scid マウスを戻し交配して得られた NOD/Shi-scid マウス (10~12 週齢) の雌 4 匹および雄 4 匹、ならびに NOD/LtSz-scid, β 2m null マウス (または、null β 2m (null) NOD/LtSz-SCID、 β 2m ミクログロブリン欠損 NOD/SCID マウスとも称する ; Jackson 研究所の Dr. Shultz, L. D. らにより作製「Kollet O, Peled A, Byk T ら、beta2 microglobulin-deficient (β 2m (null)) NOD/SHI-SCID mice are excellent recipients for studying human stem cell function. Blood 2000;95(10):3102-5」) (10~12 週齢) の雌 2 匹および雄 2 匹を用いて以下の検討を行った。

NOD/Shi-scid マウスに抗アシアロ GM1 抗体 (α AGM) で処置後、脾細胞を採取した。得られた細胞を 2 つに分け、1 つをマグネティックセルソーター (Magnetic cell sorter、MACS) を用い、CD11c 抗原陽性細胞 (樹状細胞として考える) を除去した。同様に無処置 NOD/LtSz-scid, β 2m null マウスおよび NOG マウスより、脾細胞を回収した。これら細胞の少量をとって、FACS 解析に供した。さらに、この 4 種の細胞を第 I 群: NOG マウス (3 匹); 第 II 群: α AGM 無処置 NOD/Shi-scid マウス (雄 2 匹)、 α AGM 処置 NOD/Shi-scid マウス (3 匹) および α AGM 処置後、さらに CD11c を除去した NOD/Shi-scid マウス (3 匹); 第 III 群: NOD/LtSz-scid, β 2m null マウス (4 匹) の 3 群に分け、細胞を 1×10^7 /ml in RPMI-1640 に調整しその 100μ l をウェルに入れ、等量のリステリアモノサイトジェネス (*Listeria monocytogenes*、LM) 抗原で刺激して培養した (Triplicate で実施した)。LM は 10^{11} Units/mL であるので、使用時に RPMI-1640 で 2×10^7 Units/mL となるように希釈して用いた。この際、LM 不添加のものを対照として用いた。24 時間後に上清採取、ELISA で IFN- γ などのサイトカイン量を測定した。

脾細胞におけるサブクラス (特に CD11c, CD11b) を FACS で解析した。

T 細胞マーカーとして FITC 標識 CD3、NK 細胞マーカーとしてビオチン標識 Pan NK (DX 5)、マクロファージおよび樹状細胞マーカーとして、FITC 標識 CD11c、PE 標識 CD11b を用いた。

また、NOG、C.B-17-scid、NOD/Shi-scid および NOD/LtSz-scid, β 2m null マウス (10~12 週齢) での NK 活性を、 ^{51}Cr 標識 NK 感受性 YAC-1 細胞を標的とした細胞障害性試験で検討した。すなわち、マウスより脾細胞を単離し、 ^{51}Cr 標識 YAC-1 細胞と種々の比率で混合培養した。37°C、5% CO_2 下で 4 時間培養後、上清中の放射能活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。NK 活性は下記の算定法で示される。

%特異的細胞障害性 = (特異的放射能活性 - 自然放射能活性) / (最大放射能活性 - 自然放射能活性) $\times 100$ 。

図 5 A および図 5 B に各種系統マウスより得られた脾細胞の FACS パタ

ーンを示す。

NK 細胞は、NOD/Shi-scid および NOD/LtSz-scid, $\beta 2m$ null マウスで検出された。しかし、抗アシアロ GM1 抗体無処置 NOD/Shi-scid マウスおよび NOG マウスでは全く検出できなかった。また、樹状細胞マーカーである CD11c 陽性細胞は極めて高率にこれら全てのマウスから検出された。抗アシアロ GM1 抗体無処置 NOD/Shi-scid マウス脾細胞からの磁気ビーズによる CD11c 陽性細胞の除去はほぼ完全であることが確認された。

図 6 A、図 6 B および図 6 C に上記脾細胞の LM 刺激下でのサイトカインの産生量を ELISA で検出した結果を示している。抗アシアロ GM1 抗体無処置 NOD/Shi-scid および NOD/LtSz-scid, $\beta 2m$ null マウスでは $IFN\gamma$ の産生が認められるに係わらず、NOG マウスでは全く検出できないこと、抗アシアロ GM1 抗体無処置 NOD/Shi-scid マウスから CD11c 陽性細胞を除去することによって、NOG マウスと同様に $IFN\gamma$ の産生が認められなくなることが分かった。

図 7 に各種系統マウスより得られた脾細胞の NK 活性を示す。

C. B-17-scid マウスと比較して、NOD/Shi-scid マウスでは NK 活性の減退が認められたが、NOG マウスと NOD/LtSz-scid, $\beta 2m$ null マウスでは NK 活性は全く認められなかった。

以上のことから、NOG マウスおよび NOD/LtSz-scid, $\beta 2m$ null マウスでは、NK 活性が全く消失していることが明らかとなった。しかし、FACS 解析の結果から、NOG マウスでは NK 細胞が消失しているが、NOD/LtSz-scid, $\beta 2m$ null マウスでは NK 細胞は存在するが、NK 活性が消失していることが明らかとなった。

また、NOG マウスで認められる脾細胞サイトカイン産生の減退には樹状細胞の機能不全が原因であることが明らかとなった。一方で、NOD/LtSz-scid, $\beta 2m$ null マウスでは、その FACS およびサイトカイン産生パターンは抗アシアロ GM1 抗体無処置 NOD/Shi-scid マウスとほぼ同等であることが示唆され、このマウスでは NK 細胞が消失しており、樹状細胞は正常であることが明らかであった。

実施例 3 NOG マウスを用いたヒト幹細胞の継代移植

遺伝子導入ヒト幹細胞の自己複製能を検討するために NOG マウスに臍帯血幹細胞を移植し、2 次、3 次移植の不可を検討した。

妊婦の同意と承諾の上で臍帯血を得て実験に使用した。臍帯血から CD34 陽性細胞を Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, 1.077±0.001 g/ml; Nycomed, Oslo, Norway) を用いて単核細胞を分離後 CD34 陽性細胞分離カラム (MACS, Miltenyi Biotec, Glodbach, Germany) を用いて純化した。CD34 陽性細胞の純度は 96±3% であった。

レンチウイルスベクター pCS-CG は CMP プロモーターにより GFP 遺伝子が発現するベクターであり、三好博士（筑波大学医学部免疫学）より供与された。TPO、SCF、Flk-2/Flt-3 リガンド (FL) をそれぞれ 50ng/mL 含む無血清培地 StemPro TM-34SFM (Gibco BRL) にて臍帯血 CD34 陽性細胞を 24 時間培養後、組み換えレンチウイルス CS-CG を MOI30 で 5 時間感染させた (Kawada H et al., Exp. Hematol. 27:904-915, 1999)。その後細胞を洗浄し、マウス骨髄ストローマ細胞 HESS-5 存在下に同様の無血清培地中で 5 日間体外増幅培養を行った (Oki M et al., Exp. Hematol. In press. 2001)。

7 週齢の NOD/Shi-scid マウスに 3Gy 照射後、 3×10^5 個の培養により増幅させた遺伝子導入細胞を尾静脈より移入した。6 週後にマウス骨髄細胞の表面抗原を解析し、 1×10^7 細胞を照射 NOG マウスに移植した（2 次移植）。6 週後に同様の解析をおこない 1×10^7 細胞を照射 NOG マウスに移植した（3 次移植）。さらに、6 週後に同様の解析を行った。

表面抗原の解析は FACSCalibur (Becton Dickinson) を用いて行った。使用した抗体は FITC 標識抗ヒト CD45 (T-200)、PE 標識抗ヒト CD2 (39C1.5)、CD3 (UCHT1)、CD4 (SK3)、CD14 (LeuM3)、CD19 (4G7)、CD20 (2H7)、CD33 (WM53)、CD41 (P2)、CD56 (N901) およびグリコフォリン (glycophorin A) (KC16) であり、いずれも Becton Dickinson より購入した。

CD34 陽性細胞への遺伝子導入効率は $40 \pm 5\%$ ($n=5$) であった。1 次、2 次、3 次移植マウス骨髄細胞をヒト CD45 で染色した FACS の結果を図 8

に示す。いずれのマウスにも遺伝子導入ヒト細胞の存在が認められる。

本発明の NOG マウスを宿主として利用することにより世界で初めて 3 次宿主まで移植可能な造血幹細胞に発現可能な遺伝子導入に成功した。従来の NOD-scid マウスを利用した場合には 2 次移植までしか可能ではなかった点 (Guenechea G et al., Nature Immunol, 2, 75-82, 2001) より、本マウスは造血幹細胞のアッセイ系としてより感度が高く有用であることが示された。

実施例 4 NOG マウスによる完全ヒト型抗体の産生

NOG マウス (8 週齢) は 2.5Gy、NOD/Shi-scid マウス (8 週齢) は 3.5Gy の照射をした後、ヒト臍帯血 (妊婦の同意と承諾の上で、東海大学細胞移植研究センターより供与) よりマグネットビーズで精製した CD34+細胞 $\sim 1 \times 10^6$ を静脈内に移植した。具体的には、臍帯血より MNC を Ficoll を用いて分離した後、CD34+細胞を MACS immunomagnetic separation system (Miltenyl Biotec, Glodach, Germany) により単離した。CD34+細胞は FACS により 97%以上の純度であることを確認した後、移植に用いた。

経時的に眼窩採血し、MNC 分画を Ficoll により得た後、蛍光標識した CD45、CD19、CD3 抗体 (Becton Dickinson, San Jose, CA) で染色し、ヒトリンパ球の再構成を CD45 により、B 細胞、T 細胞の割合をそれぞれ蛍光標識した CD19、CD3 により、FACS で確認した。

また、これらのマウスより胸腺、脾臓を摘出し、細胞を調製した後、細胞数を計測し、各種蛍光抗体 (Becton Dickinson, San Jose, CA) で染色して、上記の再構成確認と同様、FACS により解析した。

これらのマウスに、移植後 6 週ないし 8 週から抗原を投与した。抗原としては DNP-KLH を用いた。100 μ g/匹の DNP-KLH を水酸化アルミニウム (ALUM) をアジュバントとして腹腔内に免疫した。2 週間ごとに同様の免疫を行い、血清を採取して ELISA により抗体価を測定した。

この際の、ELISA は以下のようにして行った。

96well プレートに、抗ヒト IGs (ICN, Aurora, Ohio) または DNP-KLH で

コーティングした後、3%BSA でブロッキングし、洗浄した後、希釈した抗血清を添加した。2 時間室温で反応させた後、洗浄し、ビオチン化抗ヒト IgM または抗ヒト IgG モノクローナル抗体 (Pharmingen, San Diego, CA) を添加した。37℃ 2 時間反応させた後、洗浄し、アビジン化ペルオキシダーゼを添加し、室温 1 時間反応させた。プレートを洗浄した後、TMB ペルオキシダーゼ EIA 基質キット溶液 (Bio-Rad Laboratories, USA) を添加し、室温 30 分反応させた後、10%HCl で反応停止し、450nm の吸光度を測定した。Ig 濃度は標準曲線より算出した。

(1) 臍帯血由来 CD34+細胞の移植と再構成の効率

NOG マウスの臍帯血幹細胞移植後のヒト CD45+細胞の割合については、4 週以降、漸次末梢血ではヒト CD45 の割合が減少しつつあるが、12 週以降に突然 T 細胞の増加の割合が高くなり、これに伴ってヒト CD45 の割合も増加したものが観察された (表 3)。いままで NOD/Shi-scid 末梢血においては、このような T 細胞の増加による CD45+の割合の増加は一度も観察されなかった。この NOG マウスは、14 週まで一度も GVHD を発症しなかった。

NKGマウスにおけるヒト細胞の再構成：末梢血

表 3

SCT Gp.	ソース	CD34+cells	4週		6週		8週		10週		12週		備考
			%CD45	%CD19 %CD3	%CD45	%CD19 %CD3	%CD45	%CD19 %CD3	%CD45	%CD19 %CD3	%CD45	%CD19 %CD3	
2nd SCT	CB2	凍結融解 1.0×10^6	47.3	45.7	1.3	N.A.	N.A.	N.A.	27.5	42.7	7.2	4.9	8週で死亡のため分析
	PBSC1	凍結融解 1.8×10^6	79.5	0.7	13.4	72.5	22.9	47.7	13.3	14.3	65.7		
	PBSC2	凍結融解 1.8×10^6	30.8	3.0	0.1	62.0	63.2	3.8	68.5	93.6	2.1	23.9	
	PBSC3	凍結融解 1.8×10^6	26.9	3.7	0.0	N.A.	N.A.	N.A.	43.5	62.0	7.6	11.1	
3rd SCT	CB	新鮮 1.8×10^5	4.8	5.7	0.1	82.2	95.9	0.0	12.4	79.1	1.0	10.1	混合
	BM	凍結融解 1.9×10^5	1.7	0.0	0.0	8.2	48.2	0.0	13.5	49.8	0.0	7.0	
	PBSC2	凍結融解 1.65×10^6	1.4	2.0	0.0	51.6	91.7	0.0	25.6	91.4	0.0	85.6	
	PBSC3	凍結融解 1.65×10^6	2.1	1.3	0.2	24.1	88.4	0.0	45.3	90.2	0.0	14.3	
4th SCT	PBSC1	凍結融解 5.0×10^5	19.4	2.6	0.0	27.7	39.8	0.0	39.2	92.4	0.1		混合
	PBSC2	凍結融解 5.0×10^5	14.5	1.8	0.1	20.0	17.4	0.2	33.4	82.1	0.0		
	PBSC3	凍結融解 5.0×10^5	22.1	3.3	0.0	17.5	49.1	0.1	26.1	83.4	0.1		
5th SCT	BM	凍結融解 1.5×10^5	0.9	*	*	0.2	*	*					混合
6th SCT	BM1	新鮮 3.6×10^5											CD3 除去 CD3 除去 CD3 除去
	BM2	新鮮 3.6×10^5											
	PBSC1	凍結融解 9.0×10^5											
	PBSC2	凍結融解 9.0×10^5											
	PBSC3	凍結融解 9.0×10^5											

(2) NOG マウスにおける T 細胞分化について

A. 胸腺内 T 細胞分化について

図 9 A、図 9 B、図 10 A および図 10 B に胸腺内の T 細胞分化パターンを示した。図に示すように、このマウスにおいて胸腺内で CD3 陽性細胞が分化し、これらの細胞は通常の胸腺あるいは hu/m-RT0C によって検出されたものと同様に、CD4/CD8 DN (Double negative)、DP (Double positive)、SP (Single positive) を含み、移植後 11 ないし 13 週ですでにその一部が CD1a-low T 細胞にまで成熟していることが示された。胸腺細胞数は $1 \sim 2 \times 10^6$ と、通常のマウス胸腺細胞数の約 1/100 であった。この現象は、NOD/Shi-scid においても観察されたが、その頻度は著しく低く、8/28 (28.6%) であったのに対し、NOG マウスでは、7/7 (100%) であった。

B. 末梢の T 細胞について

図 11 A、図 11 B、図 12 A、図 12 B、図 13 A および図 13 B に、さらに脾臓細胞あるいは末梢血中の T 細胞について解析したものを示す。胸腺内で T 細胞分化が観察されたマウスにおいて、末梢でも CD3 陽性細胞が観察された。これらは CD4/CD8 陽性細胞群であり、胸腺内で分化したものを含む可能性が示唆された。

(3) NOG マウスにおける B 細胞分化について

A. B 細胞サブセット分化について

また、図 14 A および図 14 B に、骨髓細胞中の B 細胞が、CD5 を発現する割合について示した。骨髓中では、CD5 陽性のいわゆる B1a 細胞の分化は亢進しておらず、CD19 陽性、IgM 陽性の細胞群が優勢であった。また、これらの IgM high の細胞群は、CD20 を発現していた。このマウス骨髓でのヒト B 細胞の分化については、特に異常は検出されなかった。この現象は NOD/Shi-scid マウスにおける B 細胞分化においても観察されることであり、共通の性質と考えられる。

B. 末梢の B 細胞について

図 13 A および図 13 B に、末梢での B 細胞の FACS パターンを示した。

B細胞の割合はNOD/Shi-scidと殆ど変わらなかった。しかしながら、脾臓においてはCD5陽性のいわゆるB細胞の亜群であるB1a細胞が優勢であり、骨髄の分化パターンと大きな差が検出された。しかし、IgM陽性CD5陰性の細胞群も20%程度検出されており、B1a細胞のみが検出されているわけではないことが確認された。

(4) NOGマウスにおける抗体産生能について

このマウスに、抗原としてDNP-KLHを投与し、経時的にIgMおよびIgG抗体産生量を測定した。その結果、抗原非特異的IgMおよびIgG抗原特異的IgMが3回の繰返し投与により検出された。T細胞が胸線及び末梢で検出されたにもかかわらず、抗原特異的IgG産生は検出されなかった(図15A、図15Bおよび図15C)。図15A、図15Bおよび図15Cには、骨髄(BM)(図15B)、末梢血(PBSC)(図15C)由来CD34+細胞移植マウスの結果も同時に示した。これらでは、特異的IgMおよび特異性と無関係なIgG産生が臍帯血と比較して低い傾向が見られた。

以上の結果より、このマウスは、ヒトT細胞及びB細胞を分化させ、ヒト型抗体産生系に用いるのに有用であることが示された。

実施例5 新生物増殖系

NOD/Shi-scidマウスおよびNOGマウスおよびBALB/cAJcl-nuマウス(クレアより入手)およびC.B-17/Icr-scidマウス(クレアより入手)を用いた。総てのマウスは5週齢以上のものを用いた。

マウスに移植する細胞として、移植ヒト腫瘍細胞株、LM-2-JCKを用いた。LM-2-JCKは、13歳の女性患者のリンパ芽球リンパ腫から確立し、ヌードマウスへの継代異種移植で維持されている細胞株である。LM-2JCKは、T細胞抗原CD4およびCD5を発現するが、抗体も含め他の細胞抗原を発現しないことが報告されている。

異種移植アッセイのための固形腫瘍はヌードマウスの皮下で12代継代したものを用いた。腫瘍をF-10栄養補足培地(GIBCO BRL)中にハサミを用いて細切後、ピペットで十分分散させた後、ナイロンメッシュを通して細胞懸濁液を得た。懸濁液中の生細胞の濃度はトリパンブルー

(GIBO BRL) 染色により算定した。遠心後、腫瘍細胞を 1×10^7 および 1×10^6 生細胞/ml の濃度で生理食塩水に分散させた。腫瘍細胞分散液をマウスの両脇腹皮下に 25 ゲージの針を付けた 1mL シリンジを用いて 0.1mL 注入した。腫瘍細胞の注入後、1 週間毎に腫瘍の大きさと体重を測定した。 1×10^6 を移植し、腫瘍が大きくなった移植後 21 日目に、マウスを処分して腫瘍の重量およびサイズを測定した。

異なるバックグラウンドのマウスの LM-2-JCK の移植性の違いを表 4 に記した。

表 4

異なる遺伝的バックグラウンドを有するマウスへの LM-2JCK の異種移植

マウス系統	移植細胞数	観察期間	腫瘍生着マウス数/ 移植マウス数	腫瘍重量 a)
NOG	10^6	21日	10/10(100%)	3.97 ± 2.10 b)
NOD/Shi-scid	10^6	21日	10/10(100%)	1.34 ± 0.77
C.B-17/Icr-scid	10^6	21日	8/10(80%)	1.21 ± 1.06
NOG	10^5	<9週	8/8(100%) c)	n.t.
NOD/Shi-scid	10^5	<9週	5/10(50%)	n.t.
C.B-17/Icr-scid	10^5	<9週	0/10(0%)	n.t.

a) 腫瘍重量は移植21日後に測定された。平均±SD(g)で示す。

b) NOD/Shi-scidとC.B-17/Icr-scidで $p < 0.05$ (t検定)で有意差が認められる。

c) NOD/Shi-scid($p < 0.05$)とC.B-17/Icr-scid($p < 0.01$)で有意差が認められる(χ^2 検定)。

n.t.: 試験していない

1×10^6 の移植では、NOG マウスと NOD/Shi-scid マウスにおいてすべての腫瘍が生着した、一方 C. B-17/Icr-scid での生着率は 80%であった。

これらの系統での腫瘍の生着率は 1×10^5 移植のとき減少し、とくに C. B-17/Icr-scid ではすべてのマウスで腫瘍増殖が観察されなかった。

1×10^6 移植時の腫瘍の増殖曲線を図 16 に示した。

NOG マウスの腫瘍増殖は他の 2 系統に比べ勝っていた。

NOG マウスにおける 21 日めの平均腫瘍体積は、NOD/Shi-scid マウスと

C.B-17/Icr-scid の同日の平均腫瘍体積のそれぞれ 2.89 倍と 3.97 倍であり、Student t 検定において有意な差がみられた ($p < 0.001$)。

NOD/Shi-scid マウスに生着した腫瘍の 21 日めの平均体積と C.B-17/Icr-scid に生着した腫瘍の同日の平均体積との間には有意差は認められなかった。

実施例 6 NOG マウスを用いた HIV 感染モデル系の確立

NOG マウスを用いた HIV 感染モデル系の確立を種々の HIV 株を用いて検討した。代表例を以下に示す。

マウスとしては、NOG マウスを用いた。比較のため C.B-17-scid マウスと NOD/Shi マウスの両ミュータントマウスの戻し交配により以前作製された NOD/Shi-scid マウスも用いた。

使用した HIV-1 はエイズ脳症の前頭葉組織より分離され DNA クロニ化されたマクロファージと T 細胞に感染性を有する JRFL ウイルスである。さらに、env V3 領域をこの JRFL ウイルス、gp41 の下流に GFP 遺伝子を挿入した GFP-HIV-1 を用いた。

(1) ヒト単核球細胞を移植したマウスの (hu-PBL-NOG マウス) の作製

NOG マウスに直接マウス当たり 1×10^7 個の実験使用の同意と承諾を得た正常人の末梢血ヒト単核球 (peripheral blood lymphocyte (PBL)) を腹腔内接種した。比較に IL-2R γ 鎖が正常な NOD/Shi-scid マウスに同じドナーからの PBL を腹腔内接種した。

(2) マウスへの HIV-1 の感染

PBL 接種後 6 日目にマウスに 1,000TCID₅₀ のウイルスを腹腔内に接種した。ウイルス感染後 2 週目にマウスを処分し、腹腔滲出細胞を含む腹水を回収し、その中のヒト細胞数を FACS にて算出した。また、脾臓を摘出し、パラフォルムアルデヒドで固定後パラフィン包埋切片を作製した。

(3) 病理学的解析

脾臓組織切片を HE 染色し、さらに、ヒト CD3、CD4、CD8、HIV-1p24 抗原に対する抗体を用いて免疫染色を行った。免疫組織染色は、従来報告されている ABC 法に加え、EPOS 法、Envisiont 法を用いた。

hu-PBL-NOG マウスにおけるヒト細胞の定着を評価した。
表 5 に一連の検討の結果を示す。

表 5

ヒトPBMC移入NOGマウスでのHIV-1感染実験

♀ TM β 1無し PBL
NOGマウス

PBL移植 総PBL 160mL 4.37×10^8 細胞
マウス当たり 2×10^7 細胞
ドナー A
NOGマウス 14匹(♂ 6匹 ♀ 8匹)

感染

NOGマウス

JRFL	M-tropic	3匹	♂
NL4-3	T-tropic	3匹	♂
JRCSF	M-tropic	3匹	♀
NLCSFV3EGFP	M-tropic	2匹	♀
MOCK		3匹	♀

感染13日目

	細胞数 $\times 10^4$ 細胞	%HLA	%CD4	%CD8	p24
1. Mock ♀					
腹水	75	67.7	21.4	56.4	
脾臓	510	71.8	13.8	45.5	
PBL	430	77.9	16.8	49.9	0
2. Mock ♀					
腹水	130	67.6	14.8	60.5	
脾臓	698	63.3	12.7	49.2	
PBL	86	66.6	11.6	55.5	0
3. Mock ♀					
腹水	110	62.3	36.4	44.2	
脾臓	434	61.3	20.9	45.2	
PBL	93	34.7	20.6	44.7	0
4. JRFL ♂					
腹水	152	75.5	1.7	53.9	
脾臓	335	54.6	2.8	64.6	
PBL	210	42.8	2.1	77.3	3,090
5. JRFL ♂					
腹水	220	75.8	1.8	57	
脾臓	12	75.8	1.65	79.6	
PBL	870	81.1	1.8	77.9	5,445
6. JRFL ♂					
腹水	178	36.3	1.79	54.1	
脾臓	418	65.3	1.1	74.4	
PBL	65	33.1	1.72	75.6	1,961

ヒトPBMC移入NOGマウスでのHIV-1感染実験(2)

	細胞数 × 10 ⁴ 細胞	%HLA	%CD4	%CD8	p24
7. NL4-3 ♂ 脾臓小さい					
腹水	120	7.6	9.74	74.1	
脾臓	14	FACSなし			
PBL	無し				
8. NL4-3 ♂					
腹水	84	75.5	1.43	45.7	
脾臓	465	53	1.64	60.0	
PBL	26	11.3	4.59	49.3	118
9. NL4-3 ♂					
腹水	110	8.1	9.33	80.6	
脾臓	17	14.8	19.1	23.5	
PBL	3	0.6	13.0	27.8	0
NL4-3 3匹 ♂ 耳切る					
10. JRCSF ♀					
腹水	320	29.9	0.77	93.7	
脾臓	230	67	1.85	74.9	
PBL	49	33.7	0.48	71.7	3,132
11. JRCSF ♀					
腹水	63	68.5	3.18	41.6	
脾臓	390	68.7	3.58	85.8	
PBL	121	2.9	4.5	31.5	4,180
12. JRCSF ♀ 構築悪い					
腹水	110	15.2	23.0	62.4	
脾臓	380	14.5	2.98	89.8	
PBL	110	44.7	2.06	89.4	864
13. NLCSFV3EFFP ♀ 脾臓とPBLのGFP+は0.1%以下					
腹水	43	72.5	2.26	69.8	
脾臓	250	50.8	0.77	67.7	
PBL	124	76.5	5.07	63.3	271
14. NLCSFV3EGFP ♀ 腹水 脾臓PBLのGFP+は0.2~0.3%以下					
腹水	110	44.3	6.36	76.3	
脾臓	560	2.7	23.3	44.4	
PBL	127	3.4	5.26	84.2	114

すべてのHIVウイルスによりCD4陽性細胞が特異的に殺された。
従来、M-tropicウイルスのみがマウス中で増殖可能でCD4陽性細胞が
死滅することが報告されていたが、NOGマウスにおいてはT-tropicマウス
も増殖可能であった。

ヒト末梢血を移植したマウスの脾臓にヒト CD4 陽性 T 細胞ならびに CD8 陽性 T 細胞がそれぞれ脾臓中心動脈周辺に定着されることを見出した。ヒト CD3 陽性細胞数は明らかに NOD/Shi-scid マウスより NOG マウスにおけるヒト細胞数は明らかに多かった。FACS による測定では腹水中のヒト CD4 陽性細胞は平均 1×10^7 個以上であった。

一方、NOD/Shi-scid マウスでは CD4 陽性細胞はほとんど検出されず、CD8 陽性細胞がほとんどであった。前述の実施例においては NOD/Shi-scid マウスに NK 細胞の分化を抑制するマウス IL-2 レセプター β 鎖に対する抗体 (TM β -i) (マウス当り 0.5mg) をヒト PBL の接種 3 日前に腹腔に注射したが、本実施例においては行なわなかった。抗体の処理を行なったマウスは多くの CD4 ならびに CD8 陽性のヒト細胞が定着することを別の実験にて確認している。しかし、この抗体処理を行なった NOD/Shi-scid マウスからのヒト細胞数よりも NOG マウスからのヒト細胞数が 3 から 4 倍は明らかに多かった。

HIV 感染マウスにおいては HIV 抗原である p24 陽性細胞が脾動脈周囲に検出された。さらに GFP を発現する HIV 感染マウスにおいては明らかに GFP 発現細胞が脾臓ならびに腹水中に検出された。ウイルス感染細胞数は明らかに NOD/Shi-scid マウスにおけるそれより多かった。

実施例 7 NOG マウスを用いた HTLV-1 感染モデル系の確立

NOG マウスに、HTLV-1 白血病由来細胞株である MT-2 細胞をマウスあたり 2×10^7 細胞移植した。

移植後 4 週目に、リンパ腫瘍形成マウス数を数え (表 6)、リンパ腫瘍マウスに HTLV 遺伝子が感染しているか否かをサザンブロット法と PCR 法にて確認した。プロウイルス数は病理学的検索の結果、明らかに皮膚内リンパ腫と後腹腔内両側性のリンパ腫瘍さらに、腫瘍の大きなマウスは胃周辺リンパ節に転移と胸膜内に癌細胞が浸潤していた。また、末梢血に HTLV 陽性細胞が増えていた。このことは、典型的白血病となっていることを示す。さらに、肺間質内にも浸潤しているのが認められた。これらの細胞はすべて Tax タンパク質を発現していた。但し、脳内には浸

潤していなかった。

表 6

HTLV 感染細胞の移植実験

NOG マウス

マウスあたり 2×10^7 cells

	マウス数	TM β -1	細胞 ガン線処理	リンパ腫マウス数 (一ヶ月後)
NOD/Shi-scid マウス	5	—	—	0
NOG マウス	40	—	—	33 (82.5%)
NOG マウス	4	—	20,000rad	0
NOG マウス (細胞移植なし)	2	—	—	0

実施例 8 新生物細胞の移入による白血病化および NOG マウスを用いた HTLV-1 陽性細胞などの可移植性の検討

NOG マウスに各種の HTLV-1 細胞株の移植、腫瘍形成実験を行い、その有用性について検討した。

3 例の HTLV-1 白血病由来細胞株 [L=Leukemic cell lines:ED-40515 (-), MT-1 and TL-0ml]、6 例の HTLV-1 感染細胞株 [IT=Infected transformed cell lines:SLB-1, M8116, HUT-102, MT-2, MT-4 and TY9-31MT] 10^7 - 10^8 個/0.5mL を NOG マウスおよび NOD/Shi-scid マウスの左耳介後部皮下に、一部では臀部皮下に移植し、マウス内の腫瘍の大きさ、組織像、白血化の有無を経時的に比較検討し、NFkB などの転写因子、Tax タンパクの増

減との関係についても解析した。

HTLV-1 白血病由来細胞株 [L] の全例及び例外的に HTLV-1 感染細胞株 [IT] の SLB-1 は 2 週間以内に $24 \times 17 \times 11$ mm 大の腫瘍を形成したのに対し、IT の 6 例中 5 例はせいぜい $10 \times 10 \times 7$ mm にとどまり、M8116 や TY9-31MT ではほとんど腫瘍を形成しなかった (表 7)。

表 7

HTLV-1感染細胞および白血病細胞のNOGマウス中での発育とin vitroおよびin vivo 特性

細胞株	細胞系	マウス数	In vitro			移植細胞数 ($\times 10^7$)	移植経路 および部位	In vivo	
			増殖様式	II-2 依存性	Tax 発現			期間(日)	腫瘍の 大きさ(mm)
ED-40516 (-)	L	1	遊離状	-	-	7.5	l.m 腎部	16	23x18x12
		7	遊離状	-	-	7.5	s.c 後部耳介	15-16	25x18x12
		3	遊離状	-	-	4	s.c 後部耳介	16	25x18x12
		3	遊離状	-	-	1	s.c 後部耳介	15	22x17x10
SLB-1	IT	1	塊状	-	+	7.5	l.m 腎部	15	20x10x18
		7	塊状	-	+	7.5	s.c 後部耳介	15-16	20x10x18
		3	塊状	-	+	5	s.c 後部耳介	15	21x12x17
		1	遊離状	-	-	7.5	l.m 腎部	20	25x15x10
MT-1	L	1	遊離状	-	-	7.5	s.c 後部耳介	20	25x15x10
		3	遊離状	-	-	4	s.c 後部耳介	24	23x16x12
		1	遊離状	-	-	7.5	l.m 腎部	20	25x15x10
		3	遊離状	-	-	7.5	s.c 後部耳介	20	25x15x10
T1-om1	L	1	遊離状	-	-	4	s.c 後部耳介	20	22x23x8
		1	遊離状	-	-	7.5	l.m 腎部	18	ゴマ粒大
		2	塊状	-	+	7.5	s.c 後部耳介	18	ゴマ粒大
		1	塊状	-	+	7.5	l.m 腎部	18	10x10x7
HUT-102	IT	1	塊状	-	+	7.5	s.c 後部耳介	18	10x10x7
		2	塊状	-	+	7.5	l.m 腎部	18	10x10x7
		1	塊状	-	+	7.5	s.c 後部耳介	18	10x10x7
		2	塊状	-	+	7.5	l.m 腎部	18	10x10x7
MT-2	IT	1	塊状	-	+	7.5	s.c 後部耳介	18	10x10x7
		2	塊状	-	+	7.5	l.m 腎部	18	5x5x3
		1	塊状	-	+	7.5	s.c 後部耳介	18	5x5x3
		2	塊状	-	+	7.5	l.m 腎部	18	ゴマ粒大
MT-4	IT	1	塊状	-	+	7.5	s.c 後部耳介	18	ゴマ粒大
		2	塊状	-	+	7.5	l.m 腎部	18	ゴマ粒大
		1	塊状	-	+	7.5	s.c 後部耳介	18	ゴマ粒大
		2	塊状	-	+	7.5	l.m 腎部	18	ゴマ粒大

L:白血病細胞 IT:感染形質転換細胞

この腫瘍形成性細胞株の例では末梢血中の白血病細胞の出現及び臓器浸潤の度合いは比較的高いが、非腫瘍形成性細胞の例のなかにはそれ以上のものもあり（例えば HUT-102、MT-2 など）、腫瘍形成性と末梢血中の白血病細胞の出現及び臓器浸潤の程度とは必ずしも相関しなかった（表 8）。

表 8

白血病患者細胞のN0Gマウスでの種々の器官への浸潤

細胞株	腫瘍	末梢血 (PB)	骨髓 (BM)	肝臓	脾臓	肺	脳	腎臓	心臓
Ed-40515 (-)	+++	++	-	+	+	+-	海綿状変化 +-	++	-
SLB-1	+++	+++	+	++	+	顆粒状+++	海綿状変化 ++	+	+
MT-1	+++	++	-	+	+	+	海綿状変化+-	-	-
T1-oml	+++	++	-	肝腫大 +++	+	+-	-	-	-
M8116	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Hut-102	++	++	+++	結節状 +++	+++	肺炎あり +	海綿状変化 +-	-	-
MT-2	++	++	+-	+-	++	+-	-	+	-
MT-4	++	+	+-	-	++	-	-	-	-
TY9-31MT-2	+-	-	-	-	-	-	-	-	-

腫瘍形成性の ED-40515 (-) 10^7 を NOG マウスおよび NOD/Shi-scid マウスの左耳介後部皮下に移植して 2 週間目の腫瘍形成性を比較したところ、NOG マウスでは $22 \times 17 \times 10\text{mm}$ 大の腫瘍を形成したのに反し、NOD/Shi-scid ではほとんど腫瘍を形成せず、NOG マウスでの易腫瘍形成性が明らかになった (表 9)。

表 9

**ED-40515(-)細胞系を移植したNOGマウスとNOD/Shi-scidマウスの
腫瘍形成の比較**

マウス 系統	マウス 数	移植 細胞数 ($\times 10^7$)	生存 期間 (日)	腫瘍
NOGマウス	3	1	15	+++
NOD/Shi-scidマウス	3	1	15	-

+++

大きな目視可能な腫瘍

-

目視不可能な腫瘍

NOG マウスでの易腫瘍形成性が T 細胞系のみならず、B 細胞系でも同様であるかどうかを調べる目的で、EBER (EBV-Encoded Small RNA) およびベクターだけを形質転換した BJAB 細胞 7×10^7 個を NOG マウスの左耳介後部皮下に移植して 3 週間目の腫瘍形成性を比較した。BJAB-EBER では対照である BJAB-VECTOR に比較し、有意に大きな腫瘍を形成した ($26 \times 18 \times 7/13 \times 18 \times 3\text{mm}$)。その大きさは前例の ED-40515 (-) の場合の腫瘍に匹敵した (表 10)。

表 1 0

BJAB-EBER細胞株およびBJAB-VECTOR細胞株のNOGマウスでの増殖

細胞株	遺伝子導入	マウス数	移植細胞数 ($\times 10^7$)	移植経路 および部位	生存期間 (日)	腫瘍サイズ (mm)	腫瘍重量
BJAB-EBER	遺伝子導入有	3	7	後部耳介皮下	21	26x18x7	2.86g
BJAB-VECTOR	遺伝子導入無	3	7	後部耳介皮下	21	13x18x3	0.73g

NOG マウスにおける ED-40515 (-) 10^7 による効率的な腫瘍形成性は腫瘍細胞の CXCR4 を介する、腫瘍血管の活発な新生によるものであれば、内皮細胞にあるそのリガンドである SDF-1 の競合剤 (competitive agent) である KRH-1636 を持続投与しておけば、腫瘍形成が抑制されることが期待された。しかし ED-40515 (-) 及び出血を伴う (組織学的にはアンジオトロピック (angiotropic) な) SLB-1 の場合、KRH-1636 を毎日腹腔内投与したに関わらず、非投与群と変わらない $25 \times 18 \times 12 \text{ mm}$ 及び $20 \times 10 \times 18 \text{ mm}$ の大きさの腫瘍を形成した (表 1 1)。

表 1 1

NOGマウスへのHTLV-1感染細胞株移植後のIn Vivo増殖に対するCXCR4アンタゴニストの影響

細胞株	群	マウス 数	移植 細胞数 ($\times 10^7$)	薬剤投与経路	生存期間 (日)	腫瘍サイズ (mm)	備考
ED-40515(-)	薬剤	3	7.5	腹腔内 KRH-1636 0.14mg/マウス	15	25x18x12	進行性の大きな腫瘍
	対照	3	7.5	腹腔内 培地 0.2ml/マウス	15	25x18x12	進行性の大きな腫瘍
SLB-1	薬剤	3	7.5	腹腔内 KRH-1636 0.14mg/マウス	15	20x10x18	出血を伴う進行性の大きな腫瘍
	対照	3	7.5	腹腔内 培地 0.2ml/マウス	15	20x10x18	出血を伴う進行性の大きな腫瘍

ED-40515 (-) 及び SLB-1 の *in vitro* の培養細胞のサイトスピン標本と、*in vivo* の腫瘍形成細胞の凍結切片標本を用いて、酵素抗体法による CD4、CD8、CD3、CXCR4、CCR5、SDF-1 免疫染色の態度を比較検討した。CD4、CD3、CXCR4、SDF-1 ではいずれもほぼ同様に陽性で、CCR5 はいずれも陰性だった。CD8 は *in vitro* では陰性であったが、*in vivo* では陽性であった (表 1 2)。

表 1 2

FACS、WB、EMSAおよび免疫組織化学によるHTLV-1感染細胞株移植NOGマウスの
*in vitro*および*in vivo*での検討

免疫組織化学						
	CD4	CD8	CD3	CXCR4	CCR5	SDF-1
In-vitro						
ED-40515(-)	++	-	+	+	-	++
SLB-1	++	-	+	+	-	++
In-vivo						
ED-40515(-)	+++	+	+	+	-	+++
SLB-1	+++	+	+	+	-	+++

+++ 強陽性
 ++ 陽性
 + 弱陽性
 - 陰性

ED-40515 (-) の *in vitro* の培養細胞と *in vivo* の腫瘍形成細胞を用いて、Tax、CXCR4、OX40、OX40L のウエスタンブロット分析をおこなった。Tax はいずれも陰性であったが、CXCR4、OX40、OX40L はいずれも陽性であり、その強さに有意の差はみとめられなかった (表 1 3)。

表 1 3

FACS、WB、EMSAおよび免疫組織化学によるHTLV-1感染細胞株移植NOGマウスの
in vitroおよびin vivoでの検討

WB	In-vitro			
	TAX	CXCR4	OX40	OX40L
ED-40515(-)	-	++	+	+
SLB-1	++	++	+++	-

In-vivo			
TAX	CXCR4	OX40	OX40L
-	+	+	+

ED-40515(-)の in vitro の培養細胞と in vivo の腫瘍形成細胞を用いて NFkB の転写因子活性を電気泳動移動度シフトアッセイ (electrophoretic mobility shift assay (EMSA)) で検討したが、両者に差をみとめなかった (表 1 4)。

表 1 4

FACS、WB、EMSAおよび免疫組織化学による
HTLV-1感染細胞株移植NOGマウスのin vitroおよびin vivoでの検討

EMSA	In-vitro		In-vivo
	NFkB		NFkB
ED-40515(-)	+++		+++
SLB-1	+++		

N0G マウスの耳介後部皮下に移植する系において、以下の事項が認められた。

- 1) N0G マウスでは、接種後 15 日という、今まで考えられなかった極めて短期間内に大きな腫瘍形成を確実に確認できた。それに反し NOD/Shi-scid マウス (IL-2R γ chain^{+/+}) では全く腫瘍を形成しなかった。
- 2) N0G マウスでは、遺伝的に NK 細胞が欠損することが明らかにされており、したがって、C.B-17/Icr-scid や NOD/Shi-scid マウス (IL-2R γ chain^{+/+}) の場合に必須とされる抗 NK 細胞に対するモノクローナル抗体などの前処置を必要としなかった。
- 3) 耳介後部皮下に移植することにより、すなわち腹腔内よりも解剖学的にも NK 細胞がさらに少ないとされる部位を選択したことになり、腫瘍の形成を容易にするとともに、その結果、切開するまでもなく外観より腫瘍の大きさを容易に確認できた。
- 4) 内山ら (Imada K, Takaori-Kondo A, Akagi T, Shimotohno K, Sugamura K, Hattori T, Yamabe H, Okuma M, Uchiyama T: Tumorigenicity of human T-cell leukemia virus type I-infected cell lines in severe combined immunodeficient mice and characterization of the cells proliferating in vivo. Blood 86:2350-7., 1995, Uchiyama, T: Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. Annu Rev Immunol 15:15-37, 1997) が腫瘍形成しないとした MT-1、T-2、TL-Oml でもそれほど大きくはないものの腫瘍を形成した。

従って N0G マウスの耳介後部皮下に移植する系は画期的な腫瘍移植系であり、さらに T 細胞系腫瘍のみならず B 細胞腫瘍でも同様であることが明らかになった。すなわち、この系ががん細胞やヒト正常リンパ組織の移植にとっても有用な移植系であることを示している。

さらに実験動物モデルのない、あるいはあっても実用に供するのに困難な場合、この N0G マウスにヒトの細胞、組織を移植してヒト疾患モデルを構築することにより、in vitro の実験にのみ頼らざるを得なかった疾患の研究を、よりヒトの in vivo に限りなく肉迫した実験系で実験で

きることになり、疾患の成立機序の解明、治療法の開発等にこのマウスは多大な貢献をすると考えられる。例えば HIV-1 感染では強力な HAART 療法に関わらず、ウイルス血症 (viremia) のリバウンド (rebound) や変異ウイルス出現が最重要課題であり、その感染性ウイルスのリザーバー (reservoir) はリンパ濾胞の FDC (follicular dendritic cells、濾胞樹状細胞) とされており、この研究のためには、ヒトリンパ濾胞を含むリンパ組織の移植をしたヒト型モデルマウスを構築することが不可欠であり、それにはこの NOG マウスが有用である。

さらに、この系の易腫瘍形成性の要因について、in vitro における培養細胞と比して、移植された細胞ではどんな因子が増加、あるいは活性化されているかを検討した。今回使用した細胞株はすべて IL-2 非依存性であり、IL-2 産生性、さらに Tax、CXCR4-SDF-1 系は直接関係していないことがあきらかになった。しかしそのほかの因子については検索した限り in vitro の培養細胞と in vivo の腫瘍構成細胞との比較で有意の差を認めるものはなかった。

産業上の利用可能性

本発明により、従来免疫不全マウスとして知られていた NOD/Shi-scid マウスや NOD/LtSz-scid, $\beta 2m$ null マウスに比較して、異種細胞、特にヒトの細胞の生着に適した NOG マウスの作出方法、および該方法により作出されるマウスが提供される。このようにして得られたマウスにヒト幹細胞を移植することによりヒト幹細胞アッセイ系を確立することができる。また、ヒトの免疫担当細胞を移植することにより、本発明のマウスを用いてヒト抗体を作成することができる。さらに、ヒト腫瘍を移植・生着させることによりヒト腫瘍モデルマウスを作出することができ、腫瘍の治療方法、治療剤のスクリーニング等に利用することができる。さらにまた、HIV または HTLV1 に感染したヒトリンパ球が生着した HIV または HTLV-1 感染モデルマウスを作出することができ HIV-1、HTLV-1 等の in vivo における増殖機構の研究を行うことができ、またウイルス感染

治療法の開発、ウイルス感染治療剤のスクリーニング等を行うことができる。

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形および変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

請求の範囲

1. 以下のAのマウスにBのマウスを戻し交配することを特徴とする、異種細胞の生着に適したマウスの作出方法；
A：NOD/Shi マウスに C. B-17-scid マウスを戻し交配することにより得られるマウス、
B：インターロイキン2受容体 γ 鎖遺伝子をノックアウトしたマウス。
2. AのマウスがNOD/Shi-scid マウスである、請求項1記載のマウスの作出方法。
3. BのマウスがIL-2R γ K0 マウスである、請求項1または2記載のマウスの作出方法。
4. 請求項1～3のいずれか1項に記載のマウスの作出方法により作出されたマウス。
5. 機能的なT細胞およびB細胞を共に欠失し、マクロファージ機能が減退し、NK細胞またはNK活性を消失し、かつ樹状細胞機能が減退しており、優れた異種細胞生着性を有していることを特徴とする、NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ K0) マウス。
6. 移植したヒト幹細胞が、排除されることなく効率よく分化、増殖する請求項4または5記載のNOGマウス。
7. 請求項4～6のいずれか1項記載のマウスにヒト幹細胞を移植し、分化・増殖する細胞を解析することを含む、幹細胞アッセイ方法。
8. T細胞およびB細胞の分化・増殖を解析する、請求項7記載の幹細胞アッセイ方法。
9. 請求項4～6のいずれか1項記載のマウスにヒト幹細胞を移植し増殖させた後に、該マウスの骨髓からヒト幹細胞を回収しさらに、請求項4～6のいずれか1項記載のマウスに移植することを繰り返し行うことを含むヒト幹細胞を増殖させる方法。
10. 繰り返しが少なくとも3回である請求項9記載のヒト幹細胞を増殖させる方法。

11. 請求項9または10記載の方法で得られた純度が99.7%以上のヒト幹細胞。
12. ヒト幹細胞が外来遺伝子を導入したものである、請求項9または10記載の方法。
13. ヒトT細胞およびB細胞を安定に保持し、ヒト抗体を産生することが可能な、請求項4～6のいずれか1項記載のマウス。
14. ヒトT細胞およびB細胞を保持する、請求項4～6のいずれか1項記載のマウスを抗原で免疫することを含む、ヒト抗体の産生方法。
15. ヒトT細胞およびB細胞を保持する、請求項4～6のいずれか1項記載のマウスを抗原で免疫した後に該マウスから該抗原に対する抗体産生細胞を回収し、株化することを含む、ヒト抗体を産生する抗体産生細胞株を製造する方法。
16. ヒト腫瘍細胞を保持した請求項4～6のいずれか1項記載のマウスである、ヒト腫瘍モデルマウス。
17. ヒト腫瘍細胞がHTLV-1白血病由来細胞である、請求項16記載のヒト腫瘍モデルマウス。
18. ヒト腫瘍細胞を耳介に保持した、請求項16または17記載のヒト腫瘍モデルマウス。
19. 請求項16～18のいずれか1項記載のマウスを用いて抗癌剤をスクリーニングする方法。
20. 請求項4～6のいずれか1項記載のマウスにヒト腫瘍細胞を移植することを含む、ヒト腫瘍モデルマウスを作出する方法。
21. ヒト腫瘍細胞がHTLV-1白血病由来細胞である、請求項16記載の方法。
22. ヒト腫瘍細胞をマウスの耳介に移植する、請求項20または21記載の方法。
23. マクロファージトロピックなウイルスばかりでなく、Tトロピック(T細胞親和性)なウイルスに感染したT細胞を保持した請求項4～

6 のいずれか 1 項記載のマウスである、ウイルス感染モデルマウス。

24. ウイルスが HIV である、請求項 23 記載のウイルス感染モデルマウス。

25. ウイルスが HTLV-1 である、請求項 23 記載のウイルス感染モデルマウス。

26. 請求項 23 ～ 25 記載のマウスを用いて抗ウイルス剤をスクリーニングする方法。

27. 請求項 3 ～ 6 記載のマウスを用いて、NOG マウスよりも異種細胞の生着性が向上した免疫不全マウスを作出する方法。

28. NOG マウスよりも異種細胞の生着性が向上した免疫不全マウスを作出するための、請求項 3 ～ 6 記載のマウス。

FIG.1

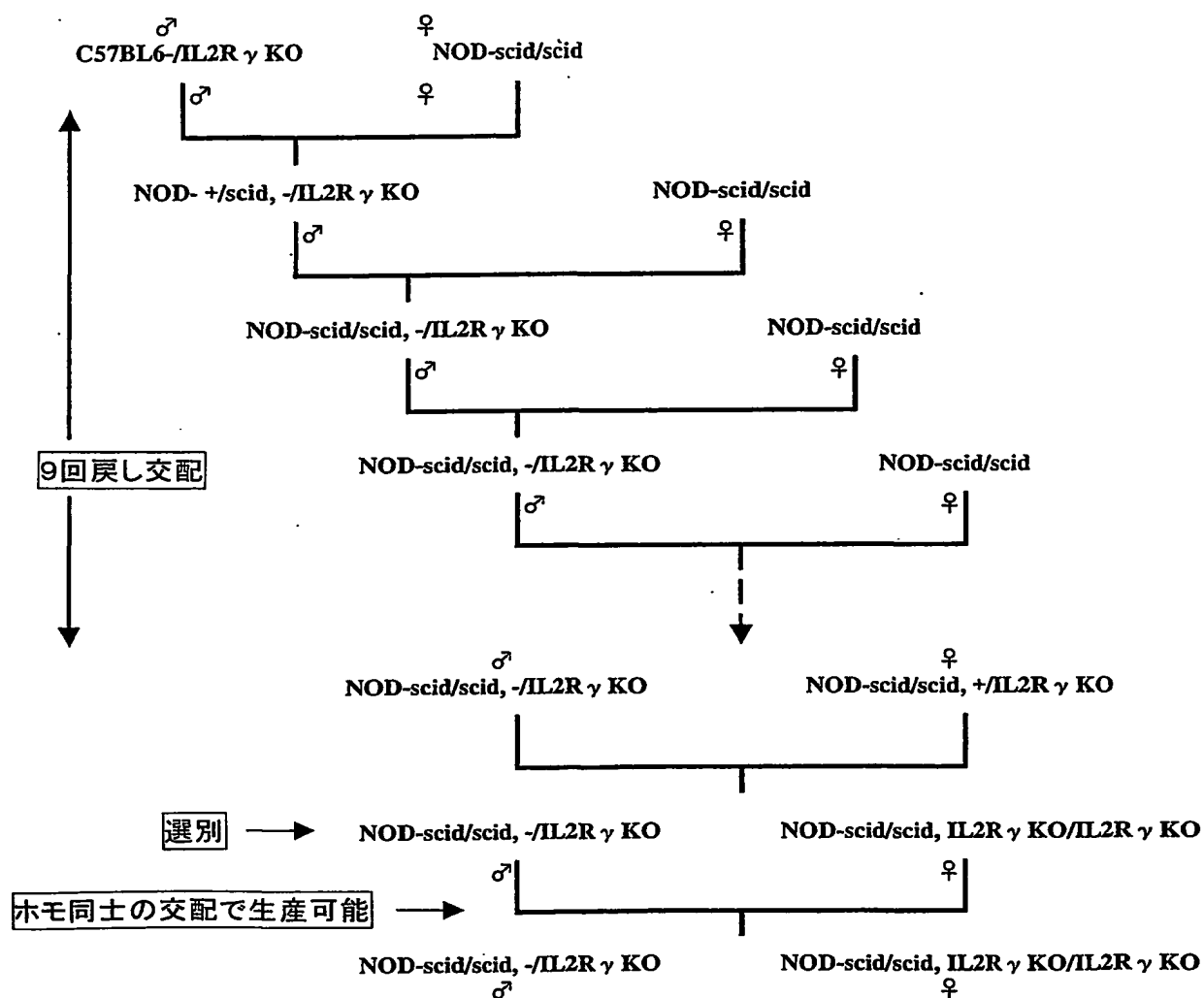


FIG.2A

マウス	hCD45+ (%)	hCD45+ (/ul)	hCD41+ (%)	hCD41+ (/ul)
4w (4週)				
I 8匹 Mean	1.345	12.503	0.037	387.087
SE	0.281	2.683	0.013	144.057
II 8匹 Mean	8.585	79.116	0.384	3096.365
SE	1.668	21.701	0.138	647.664
8w (8週)				
I 8匹 Mean	6.623	81.513	0.086	590.814
SE	3.097	33.896	0.053	349.314
II 8匹 Mean	37.152	533.456	0.380	2422.976
SE	7.324	99.283	0.112	547.911
12w (12週)				
I 7匹 Mean	5.860	61.999	2.064	1510.084
SE	2.395	22.302	1.308	769.132
II 6匹 Mean	24.086	530.097	2.586	2227.427
SE	5.789	281.806	0.600	466.970
マウスI: NOD/Shi-scid + antiAGM1				
マウスII: NOG				

FIG.2B

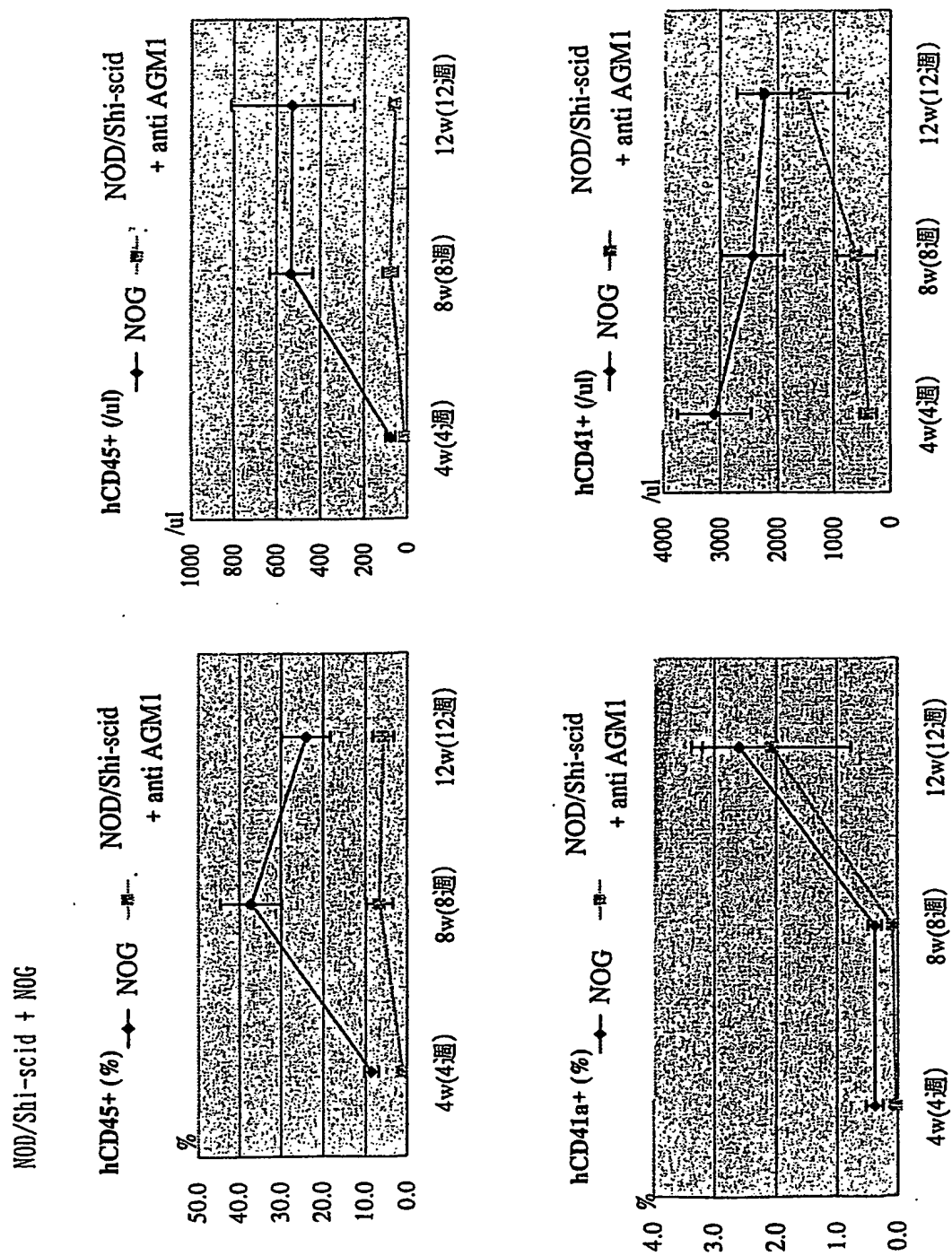


FIG.3

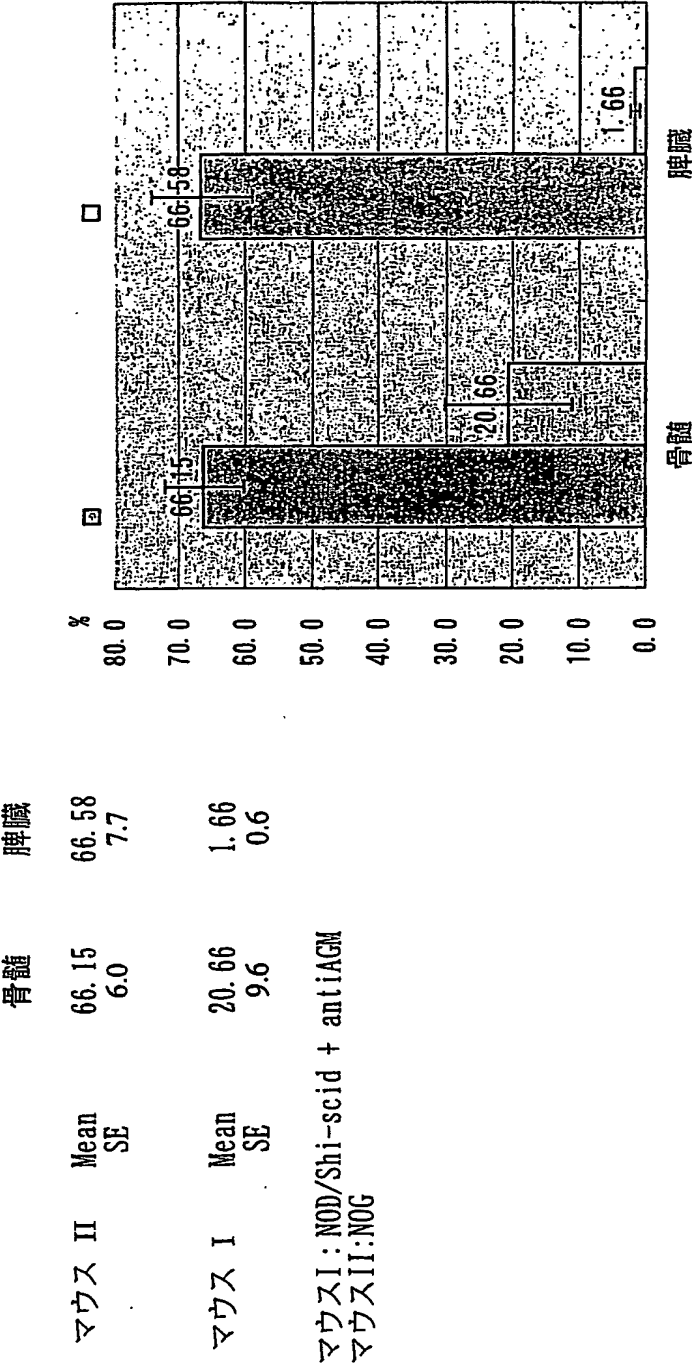


FIG.4

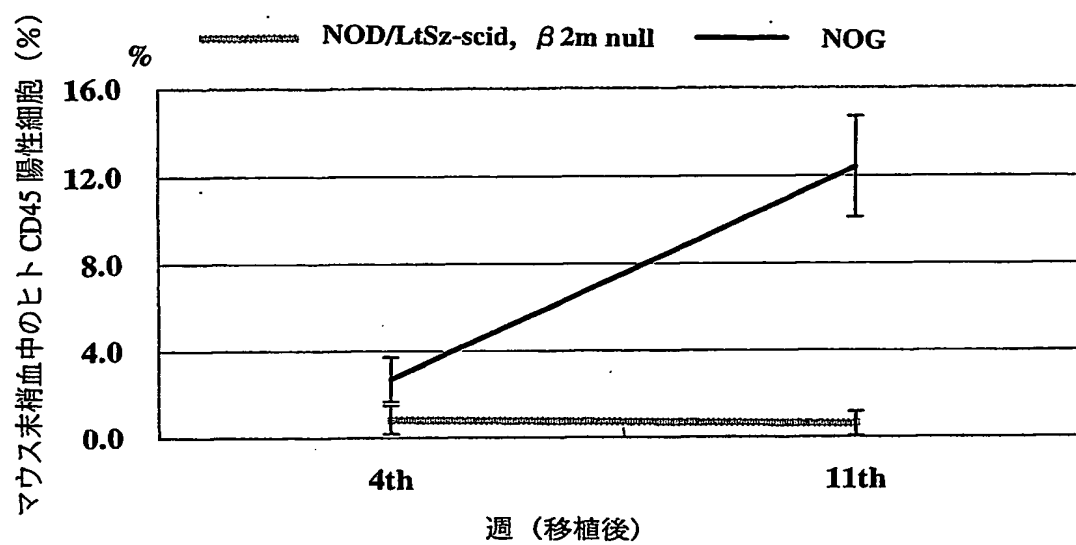


FIG.5A

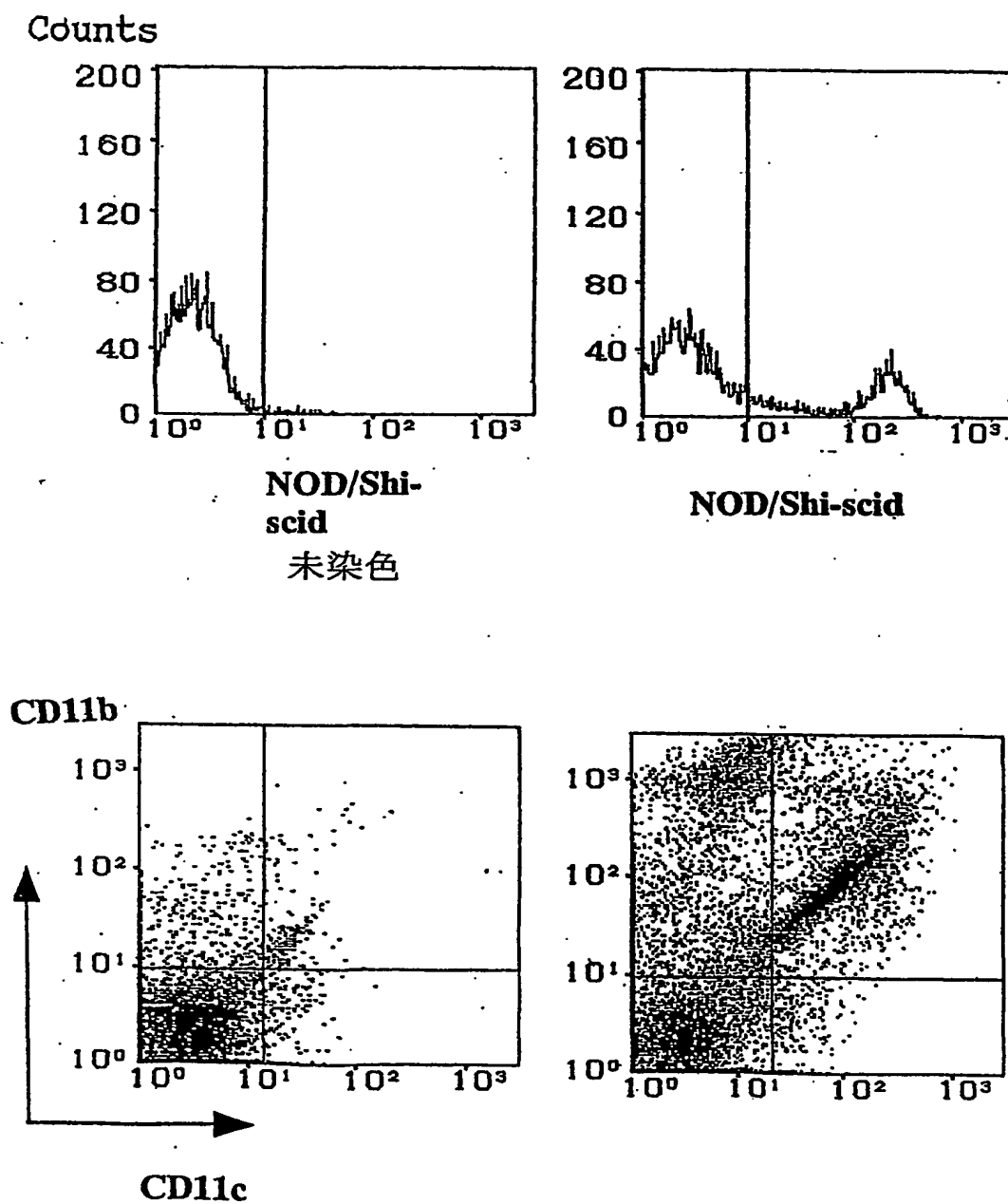


FIG.5B

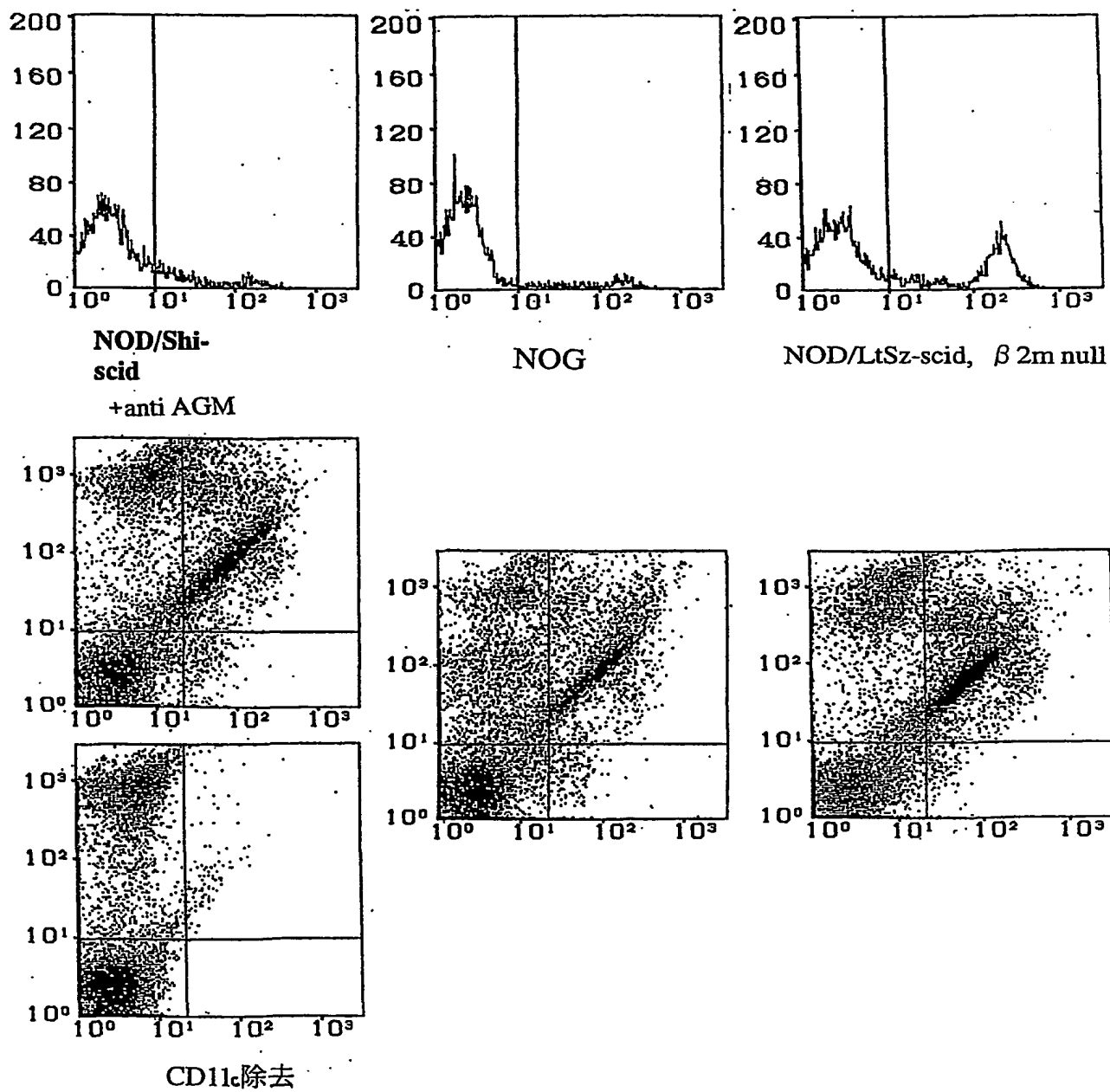


FIG.6A

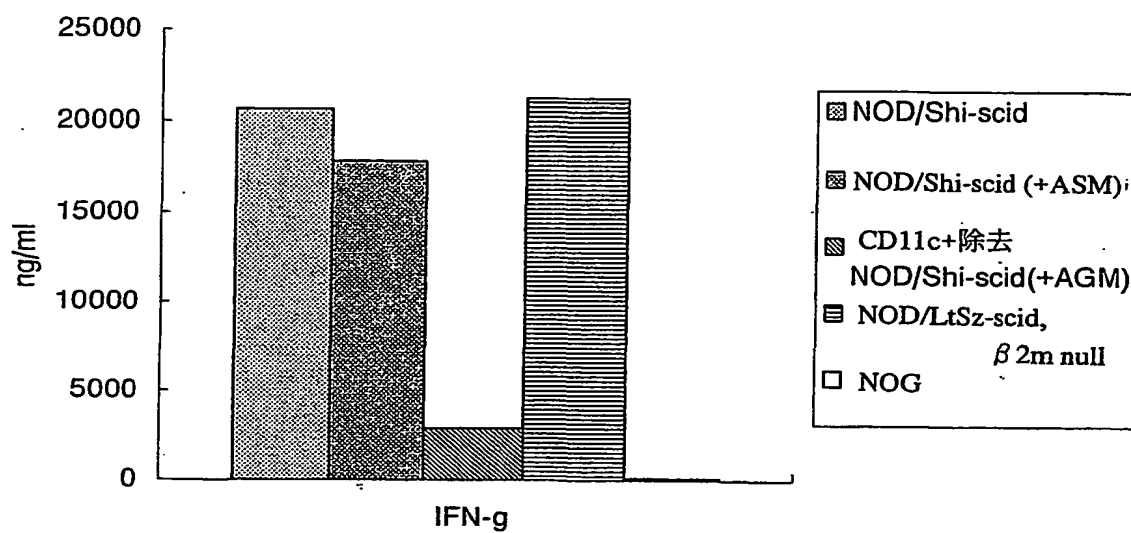


FIG.6B

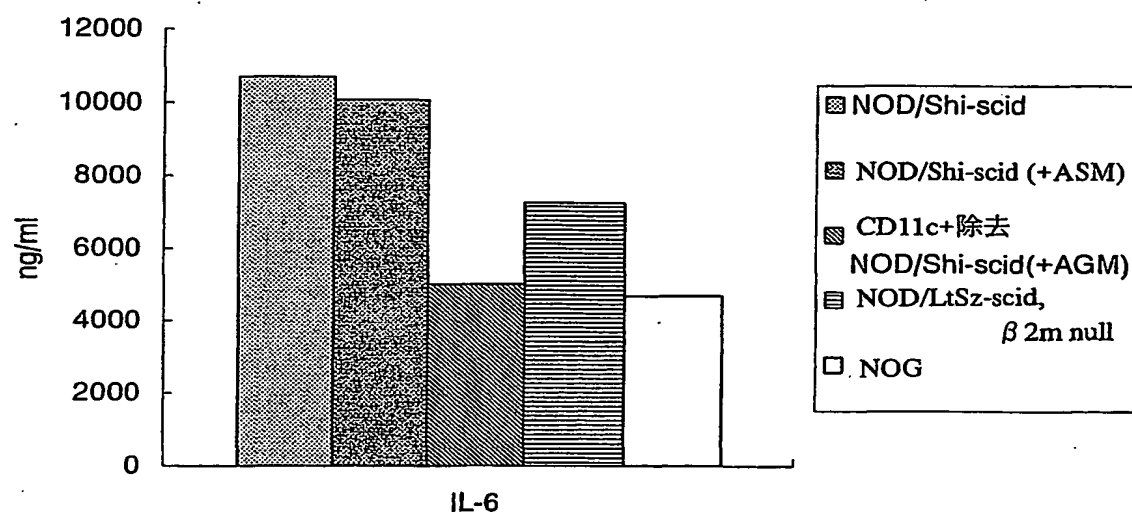


FIG.6C

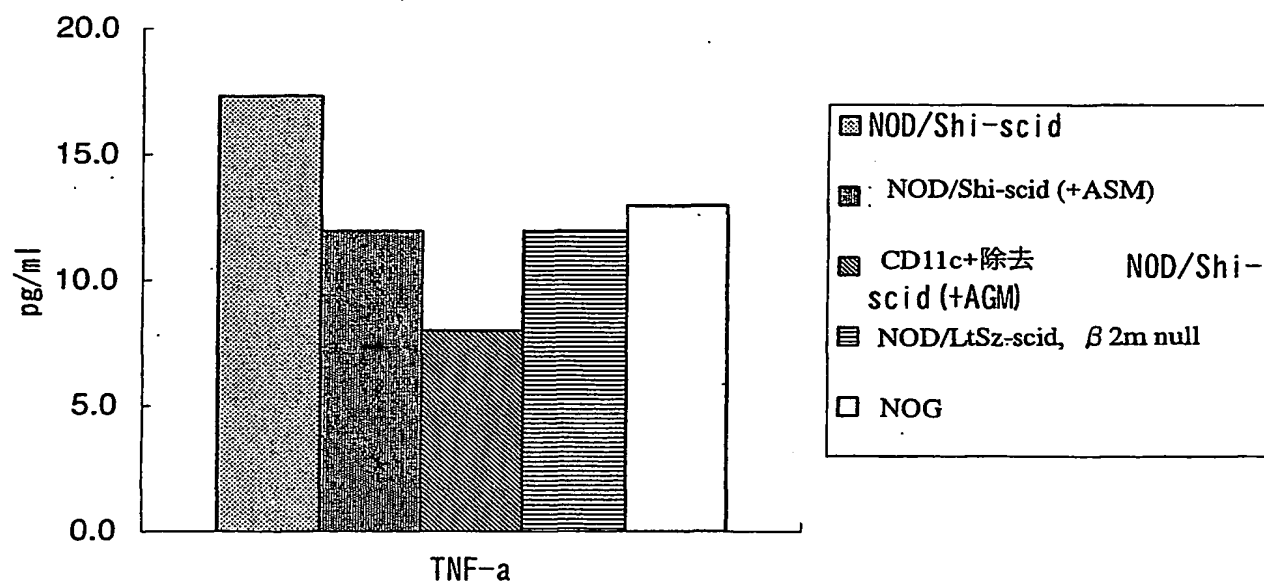


FIG.7

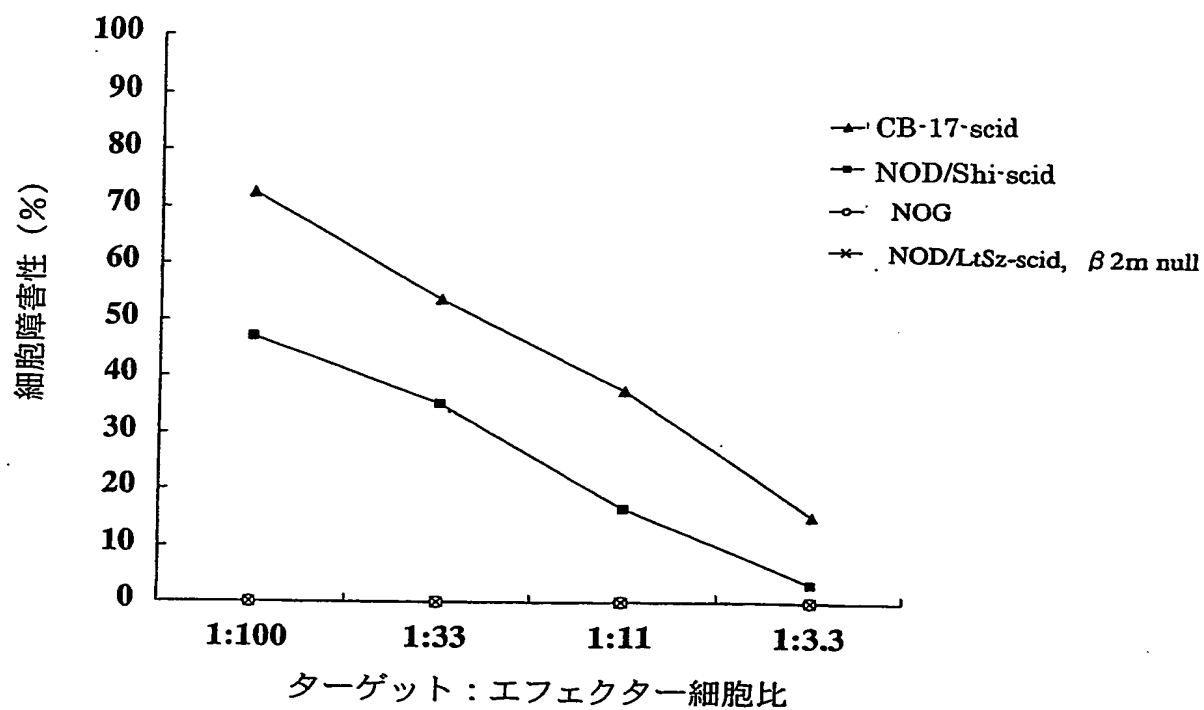


FIG.8

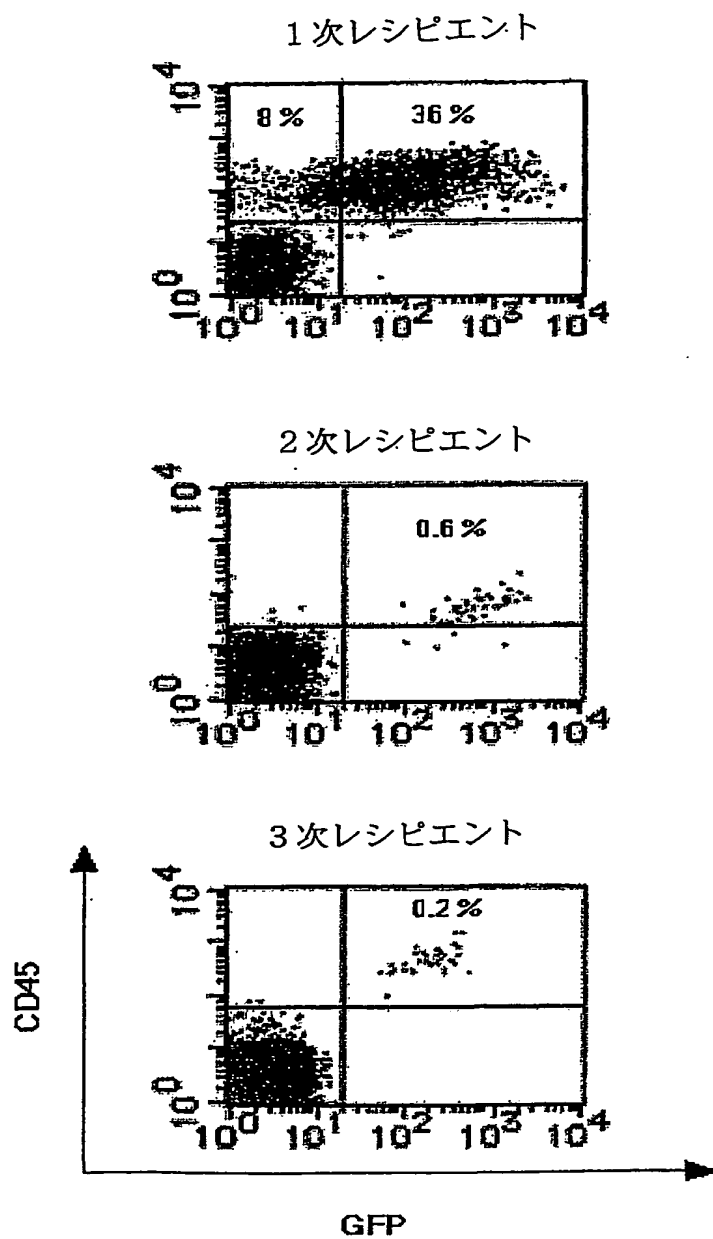
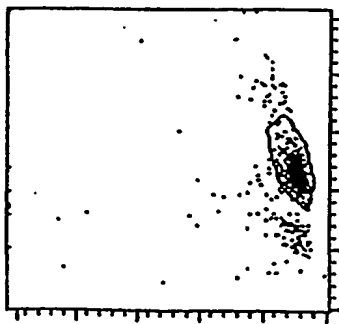


FIG. 9A

胸腺細胞解析結果

胸腺細胞数 = 2.1×10^6 個 $\times 2\text{ml}$

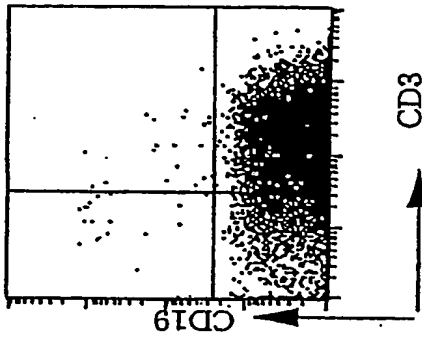


Gate	% Gated	% Total
G1	84.22	84.22
G2	94.33	94.33

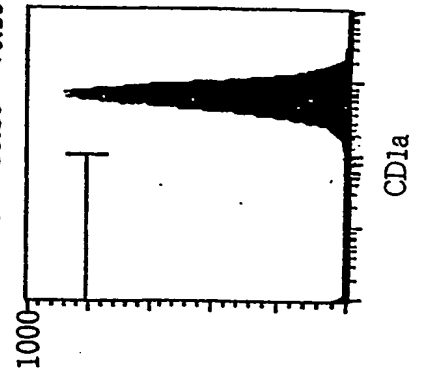
G1 = リンパ球

G2 = ヒト CD45+細胞

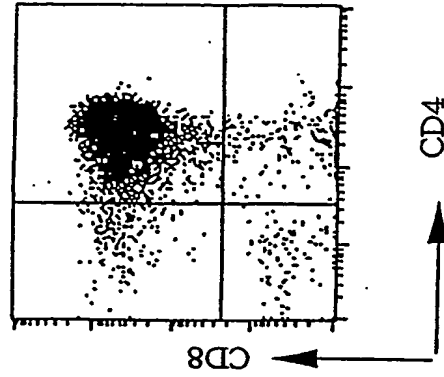
CD34+ : 5×10^5 個移植



Quad	% Gated	% Total
UL	0.09	0.07
UR	0.12	0.10
LL	16.50	13.90
LR	83.30	70.16



移植後11週解析



Quad	% Gated	% Total
UL	0.86	0.73
UR	97.26	82.48
LL	0.51	0.43
LR	1.37	1.17

Marker	% Gated	% Total
All	100.00	84.81
M1	1.14	0.97

FIG.9B

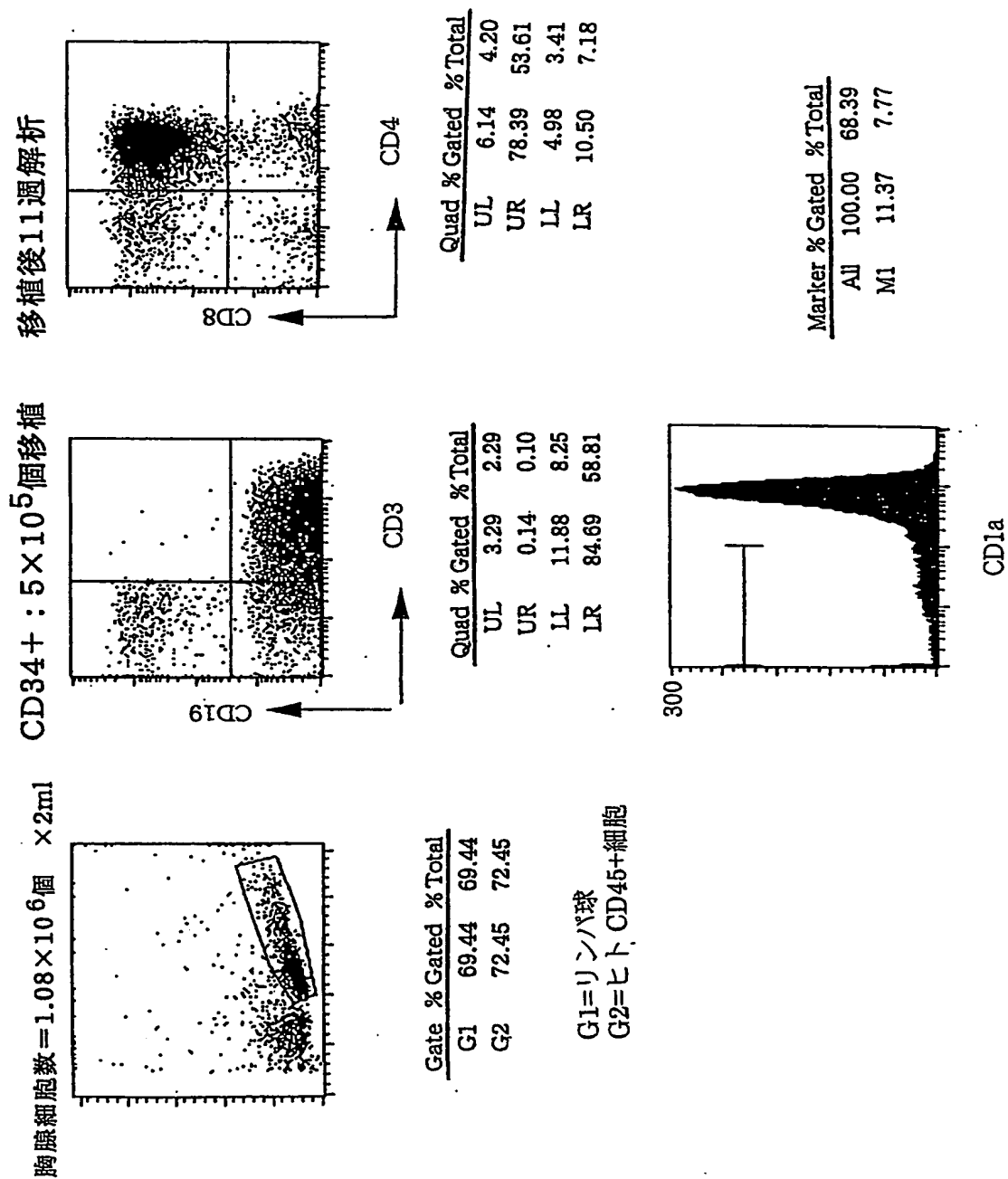


FIG.10A

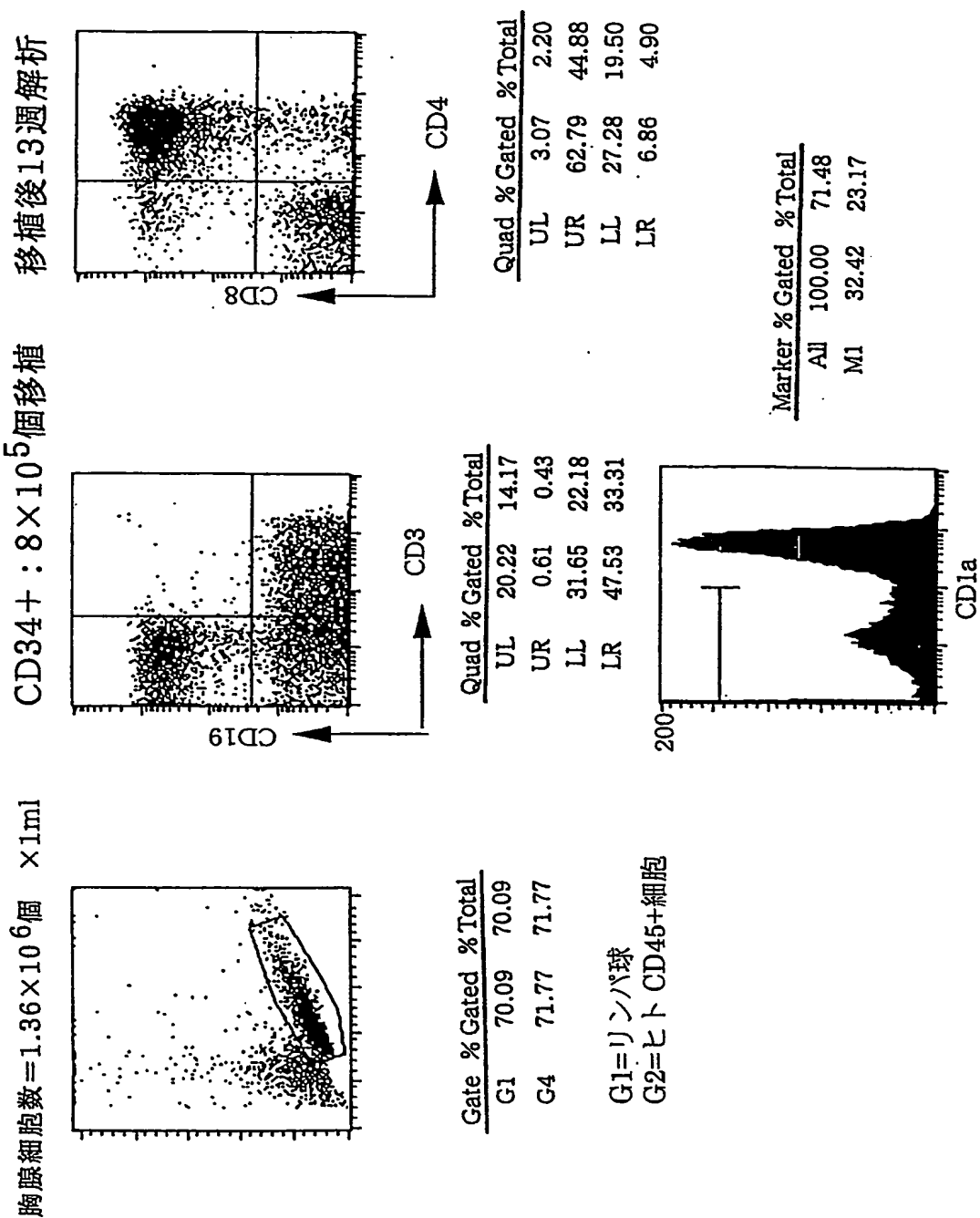


FIG.10B

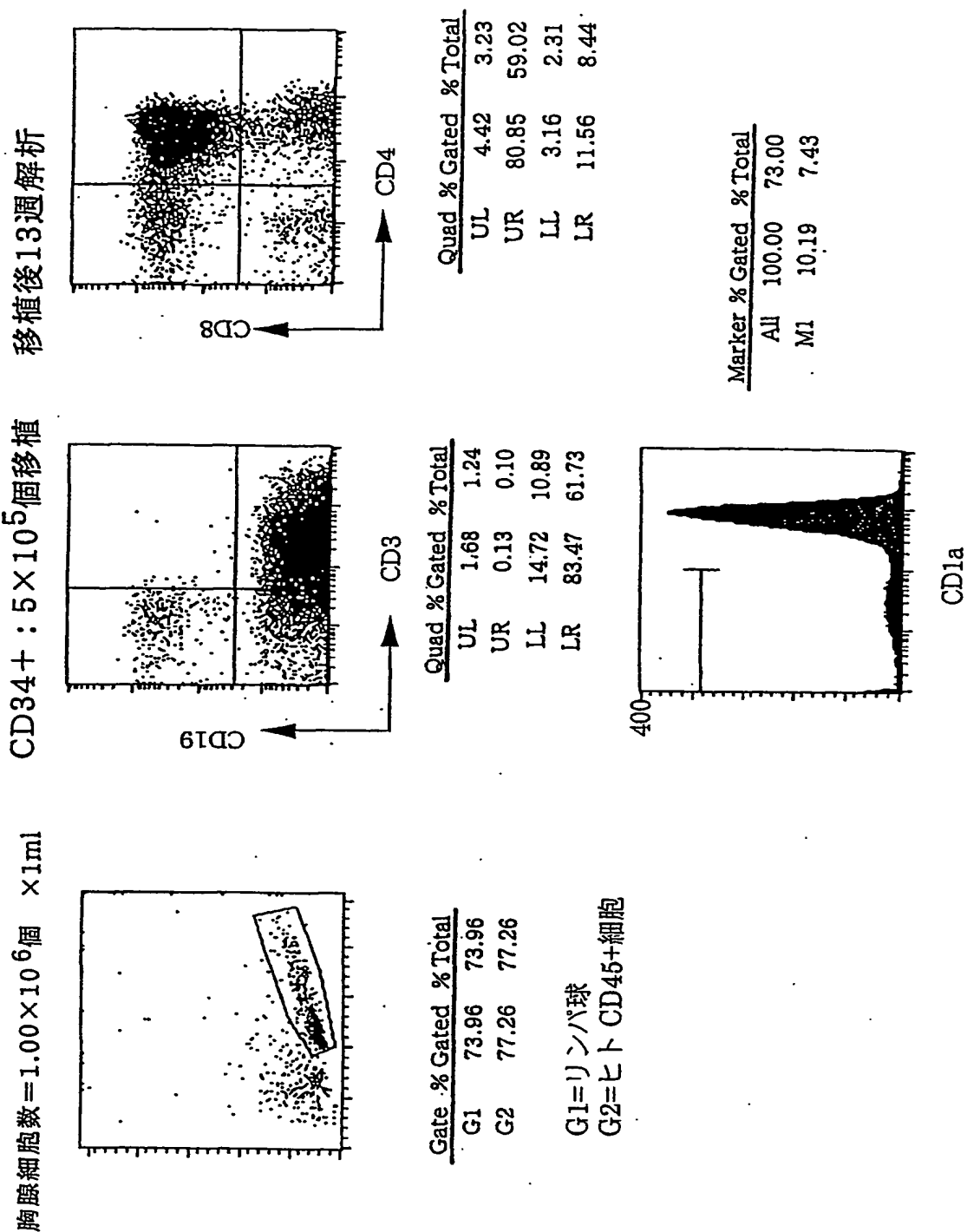
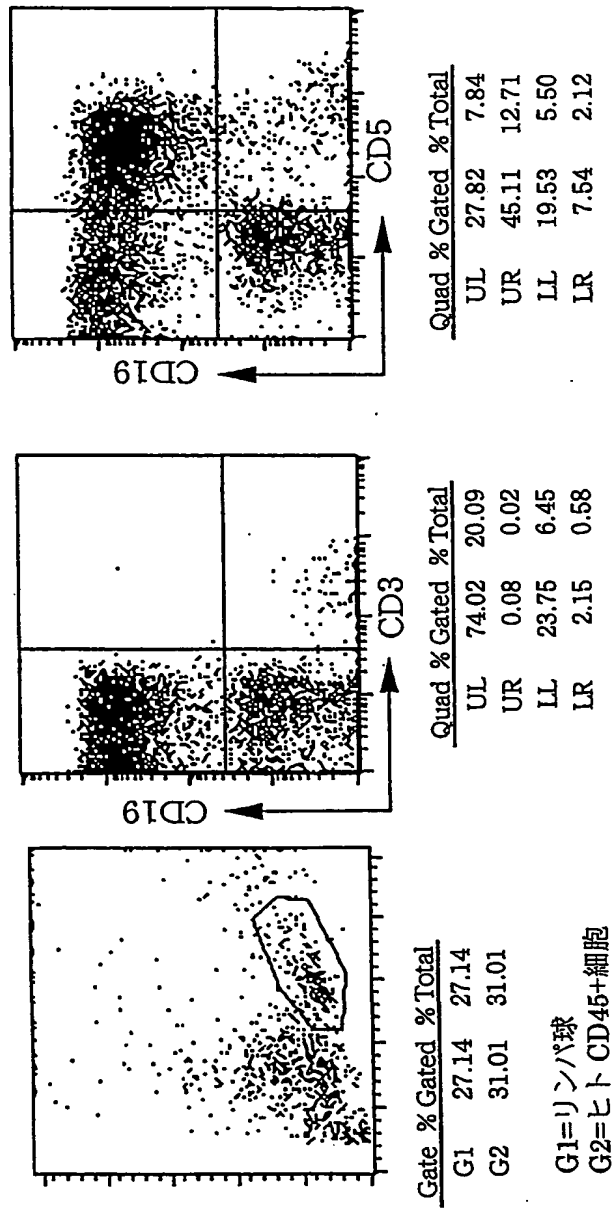


FIG.11A

脾細胞解析結果

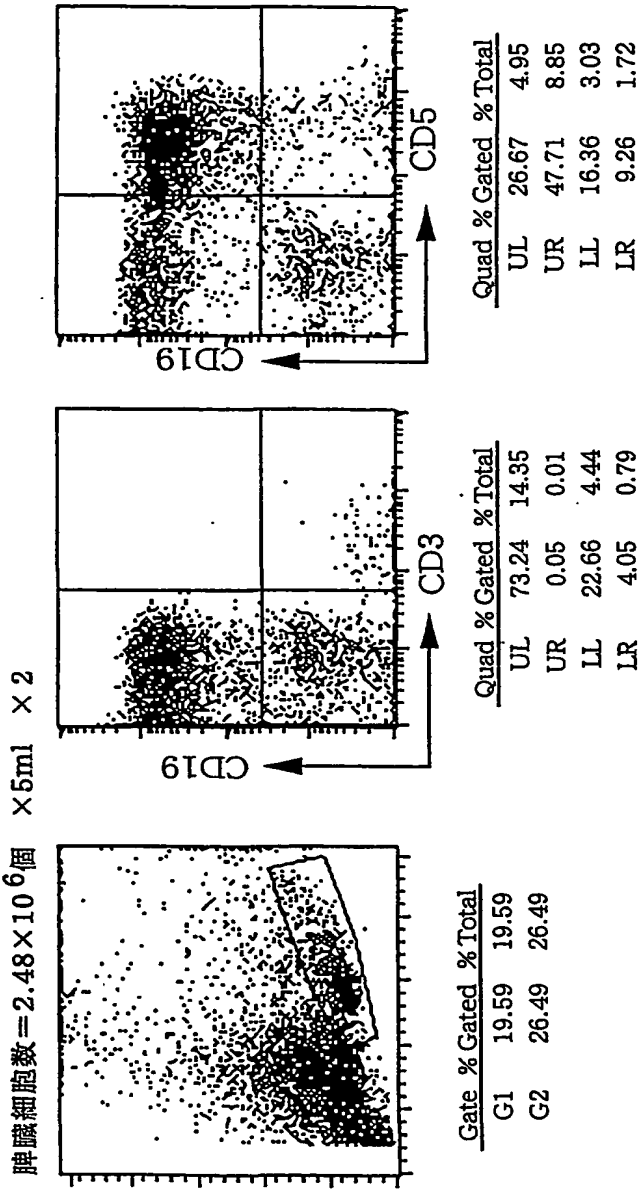
脾臓細胞数=5.02×10⁶個 ×5ml ×2



CD34+ : 5×10⁵個移植 移植後11週解析

FIG.11B

脾細胞解析結果



CD34+ : 5×10^5 個移植 移植後11週解析

FIG.12A

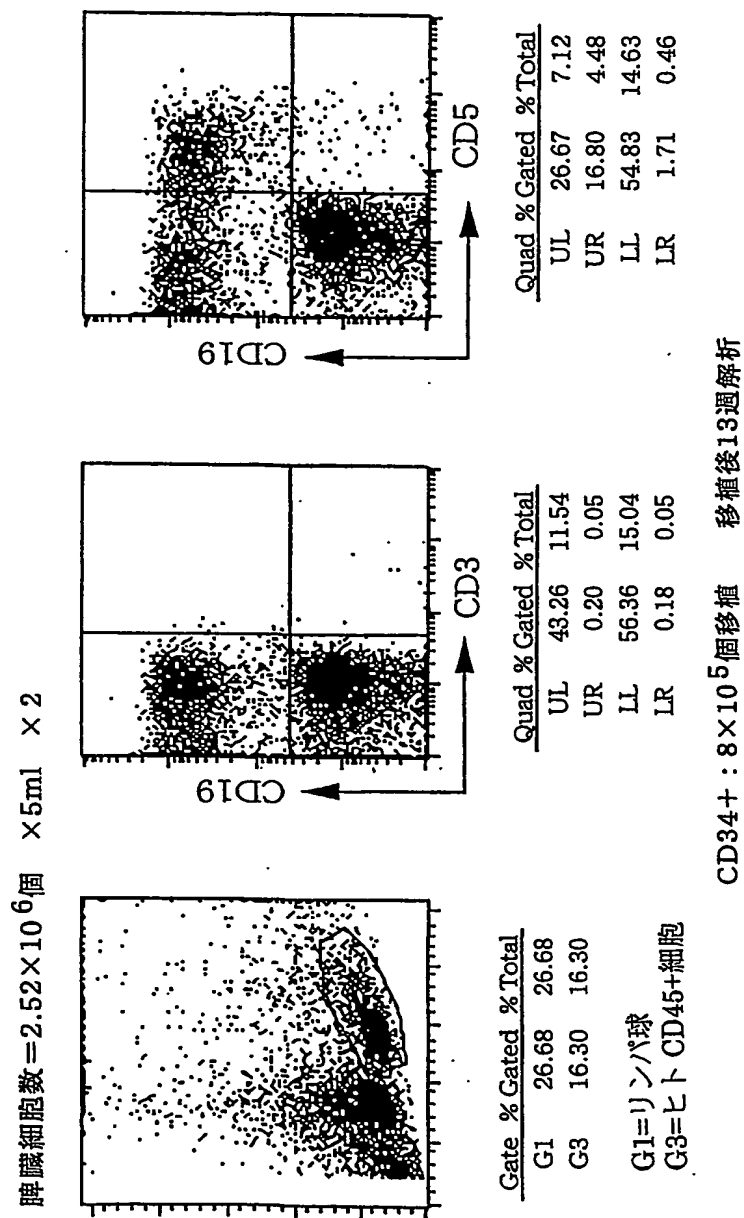
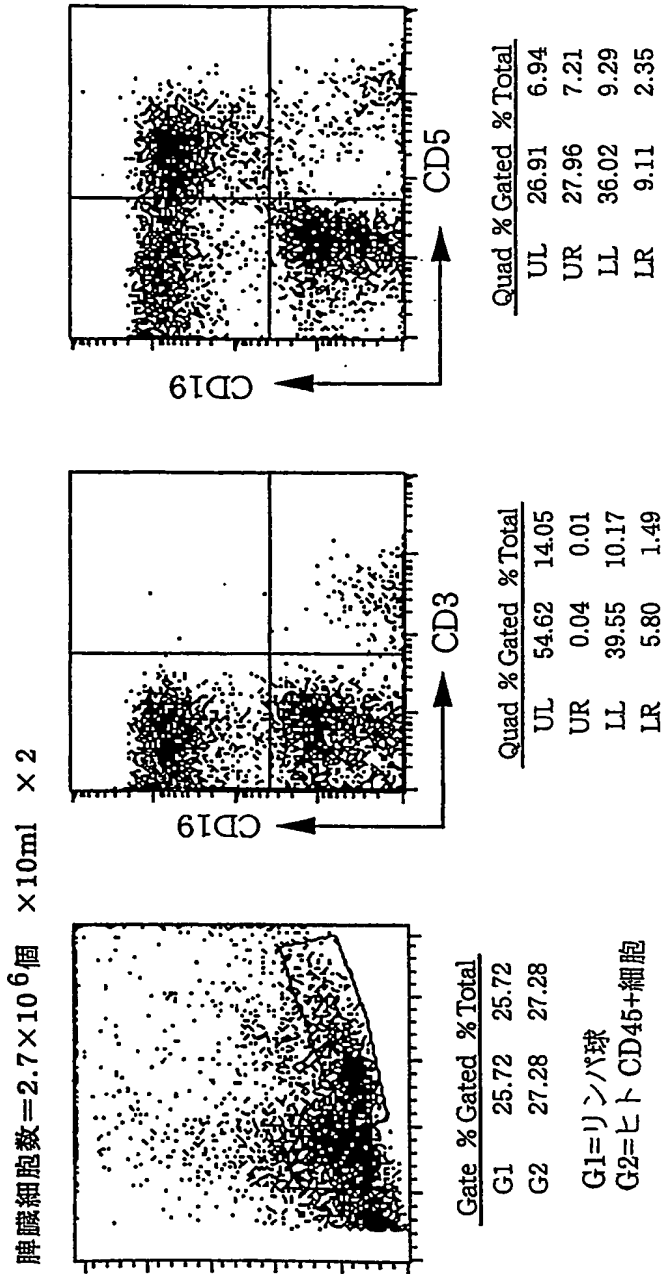


FIG.12B



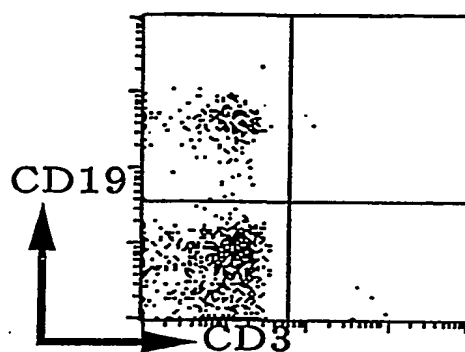
CD34+ : 5×10⁵個移植 移植後13週解析

FIG.13A

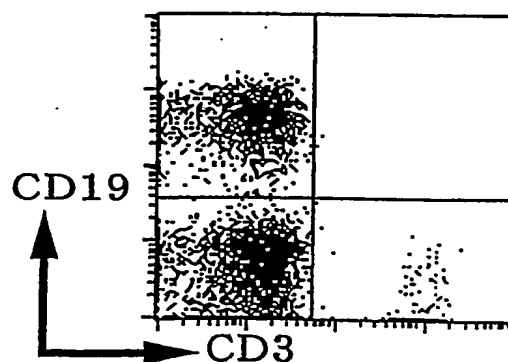
末梢血解析結果

G1=リンパ球
G2=ヒト CD45+細胞

CD34移植後1.1週



Quad	% Gated	% Total
UL	21.46	0.22
UR	0.10	0.00
LL	77.97	0.81
LR	0.48	0.01



Quad	% Gated	% Total
UL	36.19	1.75
UR	0.06	0.00
LL	60.66	2.93
LR	3.09	0.15

21/28

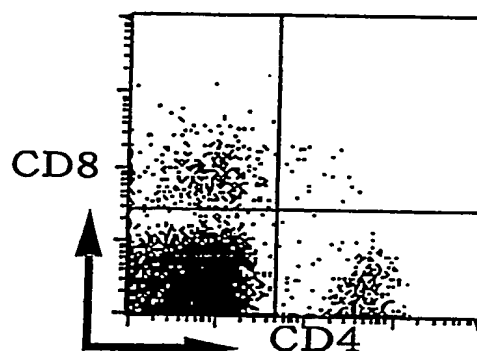
差替え用紙(規則26)

FIG.13B

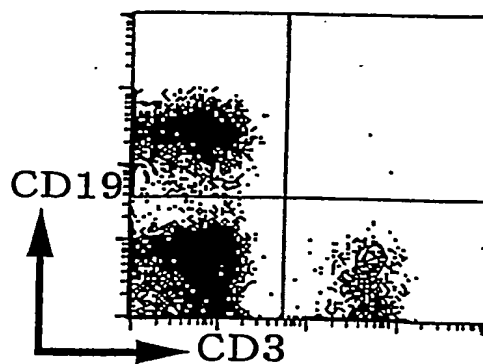
末梢血解析結果

G1=リンパ球
G2=ヒト CD45+細胞

CD34移植後 1 3 週



Quad	% Gated	% Total
UL	3.77	0.67
UR	0.18	0.03
LL	90.34	16.12
LR	5.72	1.02



Quad	% Gated	% Total
UL	31.41	3.40
UR	0.02	0.00
LL	55.11	5.97
LR	13.46	1.46

22/28

FIG.14A

骨髓細胞解析結果

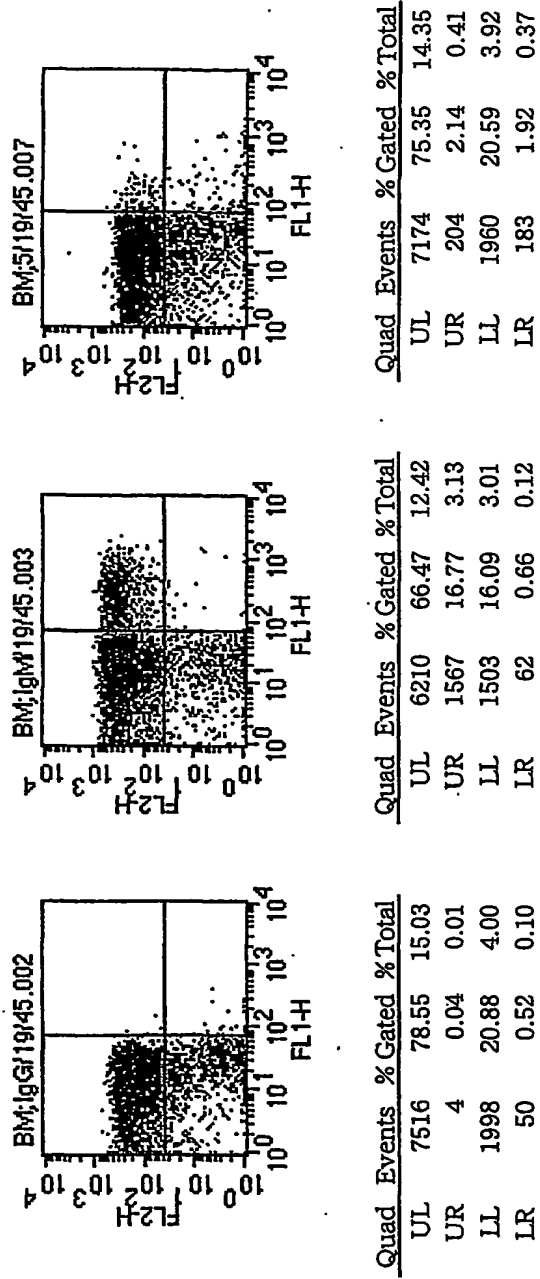


FIG.14B

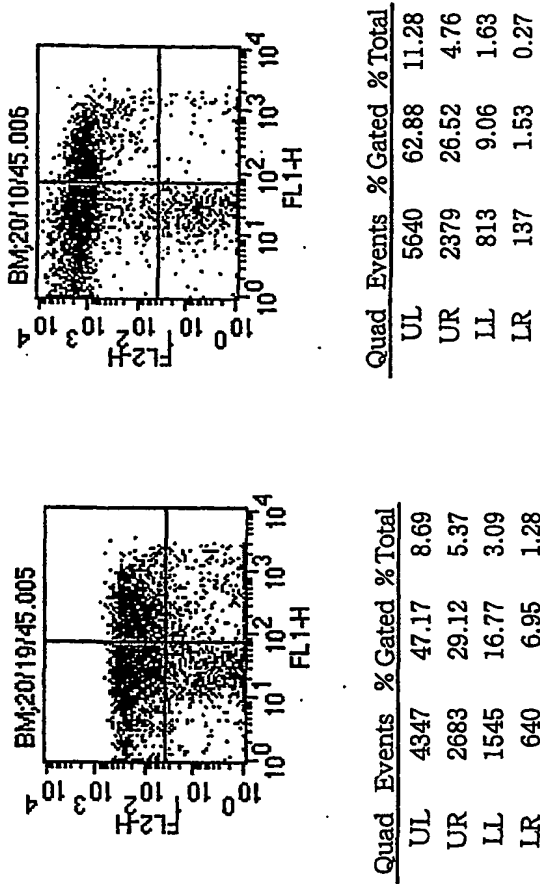


FIG.15A

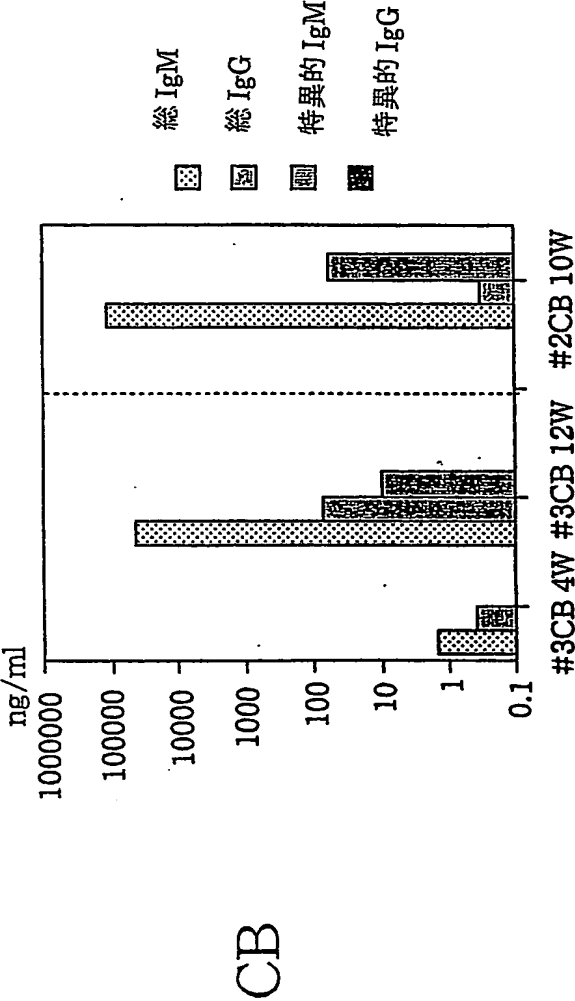


FIG.15B

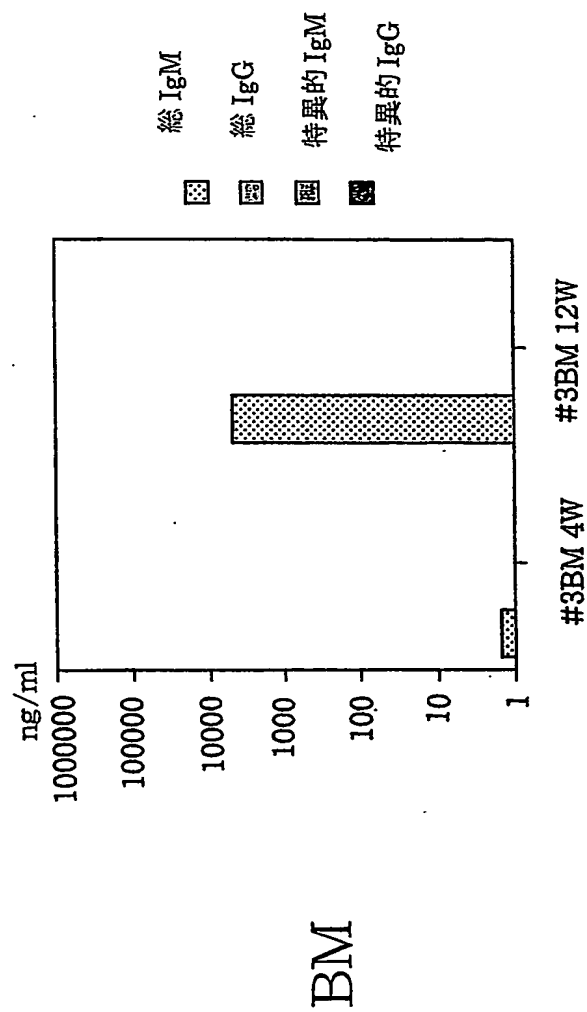


FIG.15C

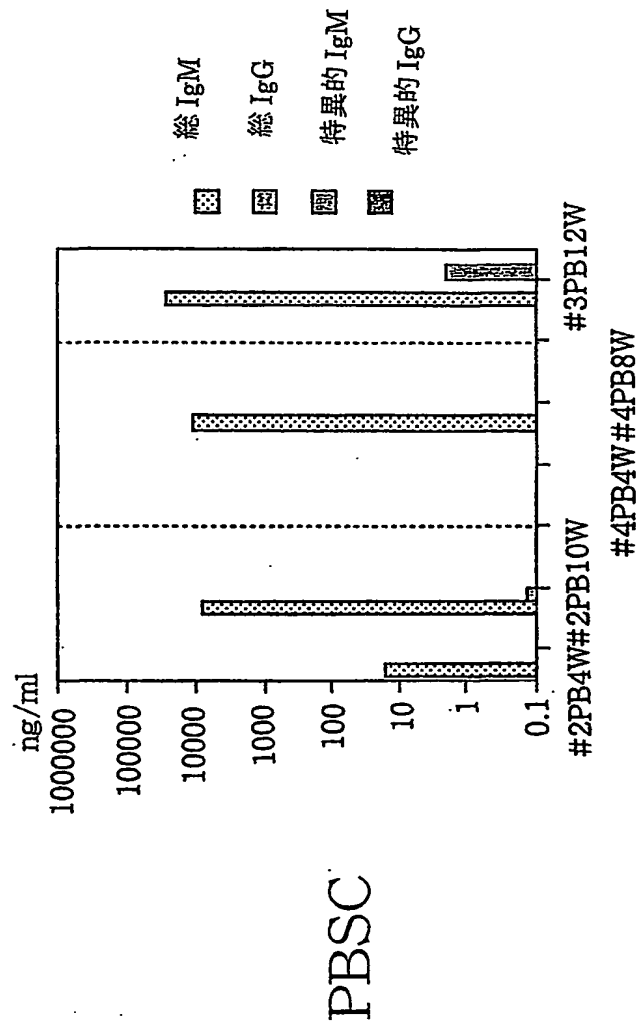
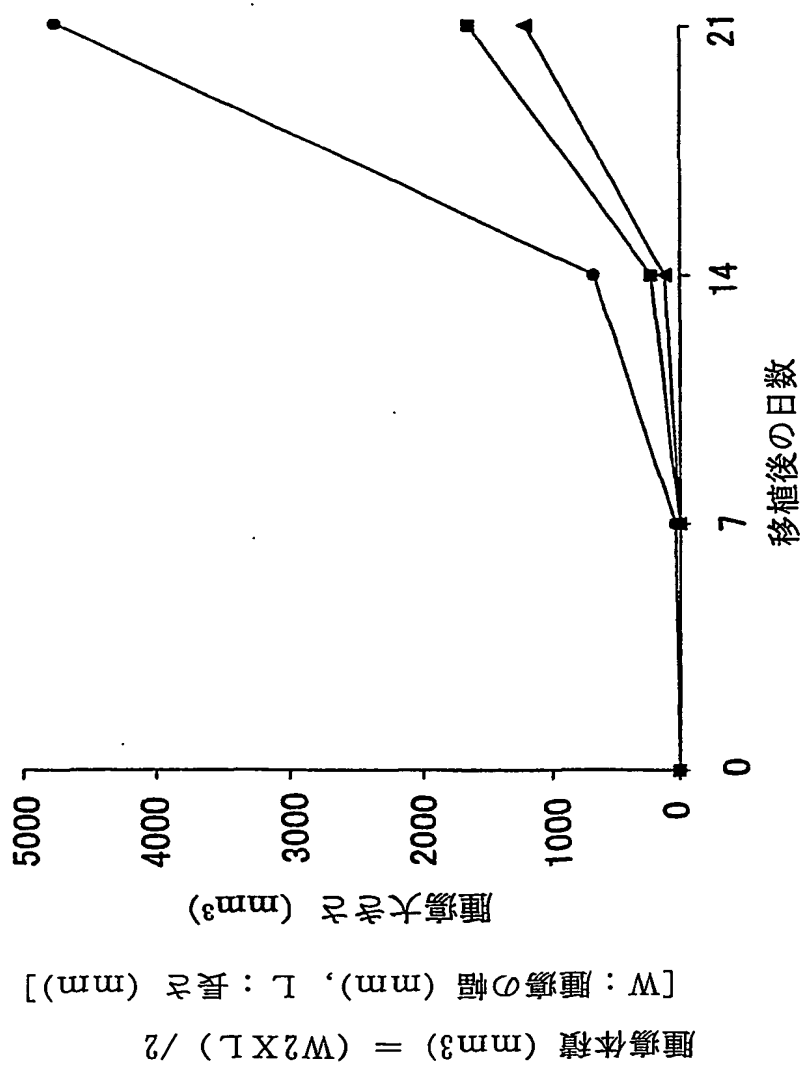


FIG.16



NOG: ●, NOD/Shi-scid: ■, C.B-17/Icr-scid: ▲.

配列表

10/533796
JC17 Rec'd PCT/PTO 04 MAY 2005

SEQUENCE LISTING

<110> Fumio Takagi, President of Central Institute for Experimental Animals.

<120> Method for Generating Mice Adopted to Adhesion, Differentiation, and Growth of Heterologous Cell.

<130>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer PI.

<400> 1

ctgctcagaa tgatgcctcc aattcc 26

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer PII.

<400> 2

cctgcgtgca atccatcttg ttcaat 26

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer PIII.

<400> 3

gatccagatt gcccaaggtag gtag 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09401

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K 67/027, G01N 33/50, G01N 33/15, A61K 39/395, C12N 15/12, C12N 5/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K 67/027, G01N 33/50, G01N 33/15, A61K 39/395, C12N 15/12, C12N 5/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, EMBASE, BIOTECHABS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	KOLLET, O. et al., Blood, Vol.95(10), pages 3102 to 3105, (2000)	1-28
A	JP 9-94040 A (Kanagawa Kagaku Gijutsu Academy), 08 April, 1997 (08.04.1997), (Family: none)	1-28
A	OHBO, K. et al., Blood, Vol.87(3), pages 956 to 967, (1996)	1-28
A	KOYANAGI, Y. et al., Folia Microbiologia, Vol.43(5), page 555, (1998)	1-28
A	KOYANAGI, Y. et al., Journal of Virology, Vol.71(3), pages 2417 to 2424, (1997)	1-28
A	REIFSNYDER, P. C. et al., Mammalian Genome, Vol.10, pages 161 to 167, (1999)	1-28
A	OHBO, K. et al., Blood, Vol.87(3), pages 956 to 967, (1996)	1-28

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 January, 2002 (22.01.02)

Date of mailing of the international search report
12 February, 2002 (12.02.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 1 A01K 67/027, G01N 33/50, G01N 33/15, A61K 39/395, C12N 15/12, C12N 5/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 1 A01K 67/027, G01N 33/50, G01N 33/15, A61K 39/395, C12N 15/12, C12N 5/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, EMBASE, BIOTECHABS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
T	Kollet O. et al., Blood, vol. 95(10) pp. 3102-3105 (2000)	1-28
A	JP 9-94040 A(財団法人神奈化学技術アカデミー)1997. 4. 8 ファミリーなし	1-28
A	Ohbo K. et al., Blood, vol. 87(3) pp. 956-967 (1996)	1-28
A	Koyanagi Y. et al., Folia Microbiologia, vol. 43(5), p. 555 (1998)	1-28

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 01. 02

国際調査報告の発送日

12.02.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長 井 啓 子



2 B

9 1 2 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Koyanagi Y. et al., Journal of Virology, vol. 71(3), pp. 2417-2424 (1997)	1-28
A	Reifsnyder P. C. et al., Mammalian Genome, vol. 10, pp. 161-167 (1999)	1-28
A	Ohbo K. et al., Blood, vol. 87(3), pp. 956-967 (1996)	1-28

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.